

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS



**Ciências
ULisboa**

**Caraterização química de impressões digitais humanas por FT-MS:
Aplicações forenses**

“Documento Definitivo”

Doutoramento em Química
Especialidade de Química Analítica

Ana Cristina Malato Monteiro de Almeida Assis

Tese orientada por:

Professor Doutor Carlos Alberto Alves Cordeiro
Professora Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

2020

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS



**Ciências
ULisboa**

Caraterização de impressões digitais humanas por FT-MS: Aplicações forenses

Doutoramento em Química

Especialidade de Química Analítica

Ana Cristina Malato Monteiro de Almeida Assis

Tese orientada por:

Professor Doutor Carlos Alberto Alves Cordeiro

Professora Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio

Júri:

- Presidente: Doutor Manuel Eduardo Ribeiro Minas da Piedade, Professor Catedrático e Presidente do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa;

Vogais:

- Doutor Sérgio Seixas de Melo, Professor Associado com Agregação da Faculdade Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra;
- Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Associado com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro;
- Doutor José Paulo da Silva, Investigador no Centro de Ciências do Mar da Universidade do Algarve;
- Doutor Carlos Alberto Alves Cordeiro, Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (Orientador);
- Doutora Marta Filomena de Sousa Silva Ferreira, Investigadora Principal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Documento especialmente elaborado para a obtenção do grau de doutor

Projecto realizado no âmbito do protocolo LPC-PJ/FCUL

Aos meus filhos

Agradecimentos

A vida é feita de percursos. Caminhos pequenos, trajectos longos. Todos eles, sejam de alcatrão ou poeira, têm o seu início e o seu fim, as suas subidas e as suas descidas... Em todas as nossas “viagens”, muitas são as pessoas que nos rodeiam, que dão cor e sabor a cada uma das nossas passadas e que muitas vezes nos incentivam a continuar. É a estas pessoas que devemos agradecer no fim de cada percurso, com a certeza de que estarão sempre do nosso lado nas nossas próximas jornadas.

Expresso o meu agradecimento à Direção Nacional da Polícia Judiciária e à Direção do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária por permitirem a realização deste projeto, com a elaboração do Protocolo e incentivo para continuar o trabalho, acreditando que este trará à Polícia Judiciária uma mais valia para a investigação criminal. À Dra Alexandra André, um especial agradecimento, pelo apoio nas recolhas efetuadas!

Os mais sinceros agradecimentos para a Professora Helena Florêncio, minha professora de sempre - de licenciatura, de mestrado e agora orientadora de Doutoramento. Ao longo de todo este tempo, as suas palavras de conhecimento, incentivo, e apoio encheram-me o coração. Muito Obrigada!

Ao Professor Carlos, o meu orientador, agradeço o apoio, incentivo e conhecimentos científicos transmitidos, os quais me permitiram realizar este trabalho, de grande importância para a minha formação científica. Muito Obrigada!

Agradeço também aos meus colegas e amigos, João e André pelo permanente e contínuo apoio e companheirismo.

Ao Eng. Daniel Etlin agradeço o apoio e a disponibilização remota do CD 3.1, imprescindível na parte final deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram para este trabalho com a sua impressão digital, o meu muito obrigada.

Ao Nuno, por tudo!...

27.junho.2020

Resumo

As impressões digitais individualizam um ser humano. São usadas no sistema judicial como evidência inequívoca da presença de um indivíduo num determinado local. Contudo, alguns dos vestígios encontrados no local do crime não permitem a análise efetiva das mesmas por motivos de distorção, por ausência de pontos suficientes que permitam a sua caracterização e comparação, ou pela não existência de amostra de referência para comparação.

A identificação da composição química original da impressão digital tem sido efetuada por diversas técnicas, tendo o desenvolvimento tecnológico dos últimos anos potenciado o recurso cada vez mais notório à espectrometria de massa. Contudo, até agora a análise química e bioquímica das impressões digitais tem sido efetuada maioritariamente por métodos de espectrometria de massa convencionais de baixa resolução.

Este estudo visa a utilização da espectrometria de massa de alta resolução com transformada de Fourier: ressonância ciclométrica de íão com transformada de Fourier (FT-ICR) e Orbitrap (ambas com ionização por electrospray (ESI) e capacidade MSMS) para a caracterização química e bioquímica das impressões digitais latentes naturais apostas em superfícies não porosas, permitindo a análise de amostras muito complexas a um nível vestigial. A espectrometria de massa do FT-ICR permitiu determinar com detalhe a composição lipídica endógena e exógena de vestígios de impressões digitais, bem como a deteção, identificação e caracterização em vestígios dermopapilares do explosivo triperóxido de triacetona (TATP). Experiências preliminares por esta técnica evidenciaram a viabilidade da diferenciação de género.

O estudo da composição endógena e exógena de vestígios de impressões digitais de 99 dadores, 46 do género feminino e 53 do género masculino, foi também efetuado por LC-MS usando um Orbitrap como analisador, com vista à implementação operacional desta metodologia analítica no Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária. Foi conseguida uma base para um futuro modelo de classificação dos vestígios por género e idade. A identificação de inúmeras substâncias exógenas, tais como medicamentos, drogas de abuso e cosméticos/produtos de higiene foi efetuada com sucesso. Esta implementação constitui uma inovação da resposta forense a nível nacional.

Palavras-chave: análise forense, impressões digitais, espectrometria de massa, FT-ICR-MS, Orbitrap, lípidos, aminoácidos, metabolómica, TATP

Abstract

Fingerprints individualize a human being. They are used in the judicial system as unequivocal evidence of an individual's presence in a particular location. However, some of the traces found at the crime scene do not allow their effective analysis for reasons of distortion, lack of sufficient points to allow their characterization and comparison, or lack of a reference sample for comparison.

The identification of the original chemical composition of the fingerprint has been carried out by several techniques, with the technological development of the last years potentiating the increasingly notorious resource to mass spectrometry. Nevertheless, until now the chemical and biochemical analysis of fingerprints have been carried out mostly by conventional low-resolution mass spectrometry methods.

This study aims to use high resolution mass spectrometry with Fourier transform: ion cyclotron resonance (FT-ICR) and Orbitrap (both with electrospray ionization (ESI) and MSMS capacity) for chemical and biochemical characterization of latent fingerprints on non-porous surfaces, allowing the analysis of very complex samples at a trace level.

The FT-ICR mass spectrometry allowed to determine in detail the endogenous and exogenous lipid composition of fingerprint traces, as well as the detection, identification and characterization of the triacetone triperoxide explosive (TATP) in dermopapillary traces. Preliminary experiments using this technique have shown the feasibility of gender differentiation.

The study of the endogenous and exogenous composition of latent fingerprints from 99 donors, 46 females and 53 males, was also carried out by LC-MS using an Orbitrap analyzer, aiming the implementation of this analytical methodology in the Laboratory of Scientific Police of the Judiciary Police. A basis for a future gender and age classifying model was achieved. The identification of numerous exogenous substances, such as medications, drugs and cosmetics / hygiene products has been successfully carried out. This implementation is an innovation of the national forensic response.

Keywords: forensic analysis, fingerprints, mass spectrometry, FT-ICR-MS, Orbitrap, lipids, amino acids, metabolomics, TATP

Preâmbulo

É patente o sucesso dos resultados de identificação obtidos com as técnicas tradicionais baseadas na análise de imagem e com as bases de dados existentes em cada país através do sistema de identificação automatizado (AFIS). Embora os procedimentos de deteção, recolha e análise comparativa estejam bem estabelecidos a nível mundial, um dos objetivos da análise química deste tipo de vestígios continua a ser a procura e o aperfeiçoamento de técnicas de deteção e visualização de vestígios no local do crime com vista à identificação do suspeito. A seleção da técnica de deteção não é realizada em função da composição química do vestígio, mas sim de acordo com o tipo de superfície de deposição e com os fatores externos ambientais a que o vestígio foi sujeito.

As impressões digitais recolhidas podem apresentar-se com pouca qualidade ou ter sido apostas parcialmente na superfície, o que impossibilita a identificação do suspeito. Também devido à irregularidade das superfícies, muitas vezes os vestígios podem estar incompletos ou distorcidos, não apresentando qualidade suficiente para uma comparação eficaz. Se o suspeito em investigação não constar na base de dados de impressões digitais torna-se impossível a sua identificação, mesmo que o vestígio recolhido seja de elevada qualidade. Desta forma, a análise das características físicas da impressão digital, apesar de importante, pode não ser suficiente no contexto pericial. Adicionalmente a recolha de impressões digitais para análise de imagem não tira partido da informação contida na composição química do vestígio e no valor desta informação no contexto forense.

Face a todos estes fatores, é do maior interesse o estudo pormenorizado da composição química de impressões dermopapilares, bem como das técnicas analíticas que potenciem uma análise mais completa e robusta, de forma a fornecer à investigação criminal elementos adicionais relacionados com o indivíduo ao qual pertence o vestígio: género, estilo de vida e atividades desenvolvidas antes do crime.

Deste modo, o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária incorporou em 2016 nos seus objectivos, o desenvolvimento de uma metodologia de análise química de vestígios de impressões digitais com o intuito de fornecer mais informação à investigação criminal. Foi celebrado nesse mesmo ano um protocolo entre o LPC-PJ e a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa de forma à utilização da Espectrometria de massa de ultra alta resolução neste projecto.

Os Capítulos 1 a 4 constituem a fundamentação teórica desta tese. No Capítulo 1 – O Processo de Identificação é abordada a evolução das impressões digitais ao longo do tempo, bem como o seu valor probatório. Este capítulo também descreve de forma sucinta aspectos importantes da Lofoscopia como os tipos de impressões digitais, superfícies e técnicas de impressão. O Capítulo 2 – A Origem das Impressões Digitais descreve a histologia da pele e a formação das cristas que dão origem à impressão digital. No capítulo 3 – Química das Impressões Dermopapilares – Estado da Arte é descrito o que até à data é conhecido no que concerne à composição química dos vestígios dermopapilares e às técnicas analíticas utilizadas. O Capítulo 4 – Espectrometria de Massa de Alta Resolução com Transformada de Fourier foca a instrumentação utilizada neste projecto.

A parte experimental é descrita no Capítulo 5 e divide-se em dois grandes sub-capítulos 5.1 FT-ICR e 5.2 Orbitrap. No capítulo respeitante ao FT-ICR descreve-se o trabalho desenvolvido recorrendo a esta técnica que visa principalmente a análise de lípidos e a identificação e deteção em impressões digitais do explosivo TATP. Foram também efectuados ensaios piloto com vista à viabilidade da discriminação de género com base na composição química de impressões digitais. No capítulo respeitante ao Orbitrap descreve-se o tipo de cromatografia utilizada e o trabalho desenvolvido recorrendo a esta metodologia. O estudo metabolómico foi efectuado, bem como as análises de intra-variabilidade, diferenciação de género e diferenciação da idade do dador do vestígio da impressão digital.

Face ao trabalho realizado, foi possível chegar a conclusões diferenciadoras que contribuem claramente para a implementação deste projecto no Laboratório de Polícia Científica.

Os resultados obtidos até à data foram apresentados nas seguintes comunicações nacionais e internacionais:

- Ana Cristina Almeida Assis, **Inovação e Desenvolvimento em Química Forense**. Química e Sociedade, Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal, 17 de dezembro de 2019. **Palestra**.
- Ana Cristina Almeida Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **Assinatura química das impressões digitais**, 18º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Coimbra, Portugal, 21 a 23 de novembro de 2019. **Comunicação oral**.
- Ana Cristina Almeida Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **Caracterização do Explosivo TATP: Identificação e rastreabilidade**, 18º Congresso Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, Coimbra, Portugal, 21 a 23 de novembro de 2019. **Poster**.

- Ana Cristina Almeida Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **Criminal investigation intelligence Fingerprints by Extreme Resolution Mass Spectrometry**, 2nd International Caparica Conference in Translational Forensics, Capuchos, Caparica, Portugal, 18 a 20 de novembro de 2019. Poster.
- Ana Cristina Almeida Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **The hidden layers of human fingerprints: Exposing Forensic evidence through extreme resolution mass spectrometry**, European Fingerprint Working Group (EFP-WG), Porto, Portugal, 9 a 12 de setembro de 2019. **Comunicação oral.**
- Ana Cristina Almeida Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **FT-ICR fingerprinting of human fingerprints**, 1st Advanced Users School, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 14 a 18 de abril de 2019. **Comunicação oral.**
- Ana Cristina Almeida Assis, **Inovação no Setor de Físico-Química**. VII Jornadas de Polícia Científica, Polícia Judiciária, Lisboa, Portugal, 12 e 13 de março de 2019. **Comunicação oral.**
- Ana Cristina Almeida Assis, Potencialidades do Setor de Físico-Química. Formação do grupo de Inativação de Explosivos da PSP: Unidade Especial de Polícia, Belas, Portugal, 26 de fevereiro de 2019. 3h.
- Ana Cristina Assis, **Desafios das Ciências Forenses**. Química e Sociedade, Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 18 de setembro de 2018. **Palestra.**
- Ana Cristina Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **FT-ICR fingerprinting of human fingerprints**. XXII International Mass Spectrometry Conference, Florence, Italy, August 26-31, 2018. Poster.
- Ana Cristina Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro, **Elementos químicos na lofoscopia**. VI Jornadas de Polícia Científica, Polícia Judiciária, Lisboa, Portugal, 20 de fevereiro de 2018. **Comunicação Oral.**
- Ana Cristina Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro. **Handmade terrorist's explosives identification by FTICR-MS**. 5th Portuguese Mass Spectrometry Meeting, Lisboa, Portugal, 20 a 22 de setembro de 2017. Poster.
- Ana Cristina Assis, Seminário '**Desafios da Ciência Forense**'. Unidade Curricular Química e Sociedade do Curso do Mestrado em Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 20 de setembro de 2017. **Palestra.**

- Ana Cristina Assis, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro. **Human Criminal characterization by FTICR-MS**. 5th Portuguese Mass Spectrometry Meeting, Lisboa, Portugal, 20 a 22 de setembro de 2007. Poster.
- Ana Cristina Assis, Carlos Farinha, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro. **Mass spectrometry fingerprint analysis: forensic intelligence to criminal investigation**, Ciências2017, Fundação de Ciências e Tecnologia, Lisboa, Portugal, 3 a 5 julho de 2017. Poster.
- Ana Cristina Assis, Carlos Farinha, Helena Florêncio, Carlos Cordeiro. **Human fingerprints through the eyes of mass spectrometry**, CQBday, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal, 31 de maio de 2017. **Comunicação oral**.
- Ana Cristina Almeida Assis, Carlos Cordeiro, Maria Helena Florêncio, Carlos Farinha, **“Houston, we have a problem”**. The international forum on pathway analysis in proteomics – PathProt-9. Instituto da Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal, 20 e 21 de outubro, 2016. **Oral communication**.
- Ana Cristina Almeida Assis, Carlos Cordeiro, Maria Helena Florêncio, Carlos Farinha, **“Identificação química de um indivíduo – “a moment in time”**. Conferência Proficiência e Inovação em Ciências Forenses, Polícia Judiciária, Lisboa, 4 outubro, 2016. **Comunicação oral**.

Foi também publicado o artigo:

Almeida Assis AC, Caetano J, Florêncio MH, Cordeiro C, **Triacetone triperoxide characterization by FT-ICR mass spectrometry: Uncovering multiple forensic evidence**. Forensic Sci Int. 2019 Aug;301:37-45. doi: 10.1016/j.forsciint.2019.04.020. Epub 2019 Apr 26.

Com base nos resultados obtidos estão a ser elaborados os seguintes artigos:

Latent fingerprint lipidomics by ESI FT-ICR mass spectrometry

Fingerprint Metabolomic characterization by FT-MS: Towards a gender and age classification model

Índice Geral	ix
Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas.....	xix
Lista de símbolos, unidades e abreviaturas	xxi
1 O Processo de Identificação.....	3
1.1 A evolução do uso das impressões digitais	4
1.2 Valor probatório das impressões digitais no processo de identificação	8
1.3 Lofoscopia	10
1.3.1 Tipos de impressões digitais	10
1.3.2 Técnicas de Detecção.....	12
1.3.2.1 Técnicas de deteção para superfícies porosas.....	13
a) Ninidrina	13
b) Diazafluorenona (DFO)	15
c) Revelador Físico	16
1.3.2.2 Técnicas de Detecção para Superfícies não porosas	20
a) Pós de revelação.....	20
c) Fumigação por Cianoacrilato	21
1.3.2.3 Técnicas de Detecção para Superfícies semi-porosas	23
1.3.3 Classificação de impressões digitais	24
2 A Origem das Impressões Digitais	31
2.1 Morfogénese	32
2.2 Estrutura da Pele	34
2.2.1 Epiderme	34
2.2.2 Derme	37
2.2.3 Hipoderme	39

2.3	Glândulas Secretoras	40
2.3.1	Glândulas Écrinas.....	40
2.3.2	Glândulas Apócrinas	41
2.3.3	Glândulas Sebáceas	42
3	Química das Impressões Dermopapilares – Estado da Arte	45
3.1	Composição Química	45
3.2	Desenvolvimento e melhoramento de Técnicas de Revelação.....	47
3.3	Datação das Impressões Digitais	49
3.4	Determinação do Género	51
3.5	Diferenciação da Idade	52
3.6	Deteção de Substâncias Exógenas	53
4	Espectrometria de Massa de Alta Resolução com Transformada de Fourier	59
4.1	Espectrometria de massa	59
4.2	História da Espectrometria de massa.....	60
4.3	Ionização por <i>electrospray</i>	64
4.4	Analísadores de massa de alta resolução.....	69
4.4.1	FT-ICR.....	71
4.4.2	Orbitrap	76
4.4.3	FT-ICR vs Orbitrap	79
5	Procedimento Experimental.....	85
5.1	Considerações.....	85
5.2	FT-ICR.....	86
5.2.1	Materiais.....	86
5.2.2	Instrumentação e Parâmetros de análise.....	87
5.2.3	Resultados e discussão	88
5.2.3.1	Estabilidade da assinatura química.....	88
5.2.3.2	Influência do suporte	90

5.2.3.3	Composição lipídica	91
5.2.3.4	Diferenciação de género	110
5.2.3.5	Deteção do explosivo TATP.....	114
5.3	ORBITRAP	127
5.3.1	Materiais.....	127
5.3.2	Instrumentação e parâmetros de análise.....	127
5.3.3	Resultados e Discussão	130
5.3.3.1	Metabolómica	137
5.3.3.2	Estudo da intra-variabilidade.....	155
5.3.3.3	Diferenciação de género	162
5.3.3.4	Diferenciação de género e idade do dador.....	170
5.3.3.5	Deteção de substâncias exógenas	185
6	Conclusão e trabalhos futuros	195
7	Referências Bibliográficas	199

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Capa do livro Finger Prints de Sir Francis Galton [7].	4
Figura 1.2 Instrumentos e informação usados para aplicação do sistema de Bertillon do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária.	6
Figura 1.3 Primeira página do primeiro Bilhete de Identidade Português, emitido em 1914, e pertencente ao então Presidente da República, Manoel d’Arriaga.	7
Figura 1.4 Impressões digitais recolhidas por Herschel em 1859 e 1913 incluídas no seu livro “A origem da impressão digital” presentemente na posse da Slough Library.	8
Figura 1.5 Classificação dos tipos de impressões dermopapilares.	10
Figura 1.6 Vestígios de impressões digitais tintada (a), por aposição em fuligem (b) e moldada (c), ampliadas 2x e obtidas com iluminação natural.	11
Figura 1.7 Vestígio de uma impressão digital latente aposta numa superfície de alumínio, ampliada 3x e obtida com iluminação natural.	12
Figura 1.8 (a) Mecanismo de reação da ninidrina com aminoácidos para formar o Roxo de Ruhemann (b) Reação do Roxo de Ruhemann com sais de metal para formar um ião complexo [30].	14
Figura 1.9 Estrutura molecular da 1,8-diaza-fluoren-9-ona (DFO).	16
Figura 1.10 Reação sugerida entre DFO e o aminoácido L-alanina para produzir um produto luminescente [37].	16
Figura 1.11 Reação de polimerização do cianoacrilato.	22
Figura 1.12 Impressão digital aposta numa cápsula de munição deflagrada, revelada com o método de deposição de metal sob vácuo [49].	23
Figura 1.13 Impressão digital aposta numa faca após esta ter sido recuperada de um incêndio, revelada com o método de deposição de metal sob vácuo [49].	23
Figura 1.14 Impressões digitais apostas numa superfície de madeira, reveladas com o método de deposição de metal sob vácuo com recurso a prata/zinco [49].	24
Figura 1.15 Classificação de impressões digitais segundo o sistema de Henry.	25
Figura 2.1 Pele da palma da mão de um dos dadores de vestígios dermopapilares, ampliada 2x e obtida com iluminação natural.	31
Figura 2.2 “Almofadas” volares digitais e palmares de um feto obtidas por microscopia eletrónica de varrimento [1].	33

Figura 2.3 Esquema representativo das várias camadas da pele e glândulas anexas [52].	34
Figura 2.4 Camadas da epiderme [54].	35
Figura 2.5 Histologia da derme [56].	38
Figura 4.1 Esquema geral de um espectrómetro de massa.....	59
Figura 4.2 Tubo de raios catódicos usado por Sir J. J. Thomson, atualmente em exposição no Museu da Ciência em Londres [161].	61
Figura 4.3 Prémios Nobel relacionados com a espectrometria de massa [162]......	61
Figura 4.4 Primeiro espectrógrafo de massa [163].	62
Figura 4.5 Esquema dos mecanismos propostos para a produção de iões em fase gasosa. ...	66
Figura 4.6 Célula ICR cilíndrica com revestimento a cobre, onde os iões entram na célula pelo lado direito [188]......	72
Figura 4.7 O movimento do ião numa Penning trap ideal é uma superposição do movimento reduzido do ciclotrão (ω_+), do movimento do magnetrão (ω_-) e de uma oscilação harmónica (ω_z) na direção do campo magnético [190]......	73
Figura 4.8 Diagrama de um equipamento FT-ICR MS (Bruker Apex) [191].	74
Figura 4.9 Seção transversal do C-trap e do analisador Orbitrap (ótica de iões e bombeamento diferencial não mostrado). O “pacote” de iões entra no analisador durante a rampa de tensão formando anéis que induzem a corrente detetada pelo amplificador (Thermo Fisher Scientific) [207].	77
Figura 4.10 Diagrama de um Orbitrap Q Exactive [207]......	78
Figura 5.1 Espectros de massa dos vestígios V1 (linha superior) e V2 (linha inferior) obtidos t_0 , $t_0 + 1$ mês e $t_0 + 4$ meses, respetivamente.	89
Figura 5.2 Espectros de massa dos vestígios de impressões digitais do dador V1 com as mãos sem qualquer preparação e com as mãos lavadas.	89
Figura 5.3 Espectros de massa dos vestígios de impressões digitais do dador V2 com as mãos sem qualquer preparação e com as mãos lavadas.	89
Figura 5.4 Diagrama de Van Krevelen dos elementos obtidos de uma das análises aos vestígios dermopapilares do dador 1. O rectângulo a vermelho representa aproximadamente o conjunto de espécies que podem ser atribuídos a lípidos.....	91
Figura 5.5 Espectro de massa de um dos vestígios, onde é identificável a prostraglandina tetranor-PGF1 α	93
Figura 5.6 Estrutura molecular do 1-(7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoil)-glicero-3-fosfato (ião a m/z 525,23786).....	98
Figura 5.7 Estrutura molecular do 1-hexadecil-glicero-3-fosfato (ião a m/z 419,25401).	98

Figura 5.8 Biossíntese de alguns derivados do colesterol.....	101
Figura 5.9 Estrutura molecular da Vitamina D3.	104
Figura 5.10 Espectro de massa de um vestígio de impressão digital do dador nº6, onde foram encontrados iões a m/z 553,29871 e 553,32954, e onde são visíveis as respectivas distribuições isotópicas.....	106
Figura 5.11 Vias lipídicas até à secreção pela pele e deposição numa superfície, adaptado de [262].	109
Figura 5.12 Gráfico representativo do número de lípidos indentificados por subclasse.	110
Figura 5.13 Análise dos componentes principais (PCA). Os triângulos a verde representam os vestígios de dador masculino, enquanto os círculos a vermelho representam os vestígios de dador feminino.	111
Figura 5.14 Análise de clustering a partir da análise de componentes principais utilizando a distância euclidiana. A cor verde representa os vestígios de dadores do género masculino, enquanto a cor vermelha representa os vestígios de dadores do género feminino.....	111
Figura 5.15 Resultados gráficos obtidos por PLS. Os triângulos a verde representam os vestígios de dador masculino, enquanto os círculos a vermelho representam os vestígios de dador feminino.	112
Figura 5.16 Imagens de cristais de TATP sintetizados com HCl - síntese 1 (A) e síntese 4 (D), ácido muriático - síntese 2 (B), e ácido sulfúrico - síntese 3 (C), ampliação 100x.....	116
Figura 5.17 Espectro de massa ESI FTICR do explosivo TATP – síntese 1-4.....	117
Figura 5.18 Fórmula de estrutura do TATP (C ₉ H ₁₈ O ₆).....	118
Figura 5.19 Experiências CID dos iões a m/z 501,21557; 575,25259; 649,28948; 723,32638 e 797,36475.....	123
Figura 5.20 Espectro de massa ESI-FTICR do vestígio de impressão digital de controlo (A), vestígio de impressão digital com TATP produzido com ácido muriático como catalizador (síntese 2) (B) e vestígio de impressão digital com TATP produzido com HCl p.a. como catalizador (síntese 4) (C).	126
Figura 5.21 Gráfico representativo da população de estudo.	128
Figura 5.22 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género feminino de 53 anos, no intervalo de tempos de retenção de 0,61 a 1,61min.– Sistema 1.....	131
Figura 5.23 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género masculino de 19 anos para o tempo de retenção de 0,72 min. – Sistema 2.....	131

Figura 5.24 Gráfico representativo do número de espécies detetadas no sistema cromatográfico 2.....	132
Figura 5.25 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género feminino de 21 anos para o tempo de retenção de 18,19 min. – Sistema 3.....	132
Figura 5.26 Gráfico representativo do número de espécies detetadas no sistema cromatográfico 3.....	133
Figura 5.27 Mecanismos de retenção da coluna HILIC (Thermoscientific.com).....	134
Figura 5.28 Diagramas de caixa de cada uma das amostras em estudo.....	136
Figura 5.29 Representação de um diagrama de caixa.....	137
Figura 5.30 Espectro de massa MS ² da fenilalanina.....	140
Figura 5.31 Reação de transformação da fenilalanina em tirosina, pela enzima fenilalanina hidroxilase [327].	140
Figura 5.32 Reação de descarboxilação da histidina [327].....	141
Figura 5.33 Aminoácidos de cadeia ramificada.....	141
Figura 5.34 Espectro de massa MS ² da isoleucina.....	142
Figura 5.35 Espectro de massa MS ² da leucina.....	142
Figura 5.36 Espectro de massa MS ² do triptofano.....	143
Figura 5.37 Transformação do L-glutamato em L-alanina [327].	145
Figura 5.38 Espectro MS ² da arginina.....	146
Figura 5.39 Espectro de massa MS ² da prolina.....	147
Figura 5.40 Via metabólica de interconversão da arginina, ornitina e prolina.....	147
Figura 5.41 Espectro de massa MS ² da tirosina.....	148
Figura 5.42 Biossíntese de neurotransmissores [327].....	149
Figura 5.43 Espectro MS ² da N-acetilglutamina.....	150
Figura 5.44 Síntese da asparagina [329].	150
Figura 5.45 Reacção química entre dois aminoácidos.....	151
Figura 5.46 Síntese da aminoacetona a partir da treonina [333].....	152
Figura 5.47 Espectro de massa MS ² da guanina.....	153
Figura 5.48 Bases esfingóides que formam os esfingolípidos.....	153
Figura 5.49 Espectro de massa MS ² da α,α trehalose.....	155
Figura 5.50 Diagramas de caixa de cada amostra recolhidas nos cinco dias.....	156
Figura 5.51 Análise PCA das amostras recolhidas nos cinco dias.....	157
Figura 5.52 Diagramas de caixa dos aminoácidos serina, histidina, leucina e prolina nos cinco dias de recolha dos vestígios das impressões digitais de um dador.....	158

Figura 5.53	Diagramas de caixa dos aminoácidos fenilalanina, alanina, arginina e ácido glutâmico nos cinco dias de recolha dos vestígios das impressões digitais de um dador.	159
Figura 5.54	Diagramas de caixa dos péptidos Phe-Ala e Gly-Phe detetados nos cinco dias de recolha de vestígios de um dador.	160
Figura 5.55	Diagramas de caixa da trietanolamina, creatina e lactaldeído detetados nos cinco dias de recolha de vestígios de um dador.	161
Figura 5.56	Análise PCA de 97 vestígios.	162
Figura 5.57	Gráfico dos compostos que explicam a variância do PC1 vs PC2.	163
Figura 5.58	Dendograma e Heatmap representativo dos iões discriminantes e sua classificação de acordo com o género (masculino ou feminino). O gradiente de cores representa variações de intensidade.	164
Figura 5.59	Gráfico de PLS-DA onde são assinalados a amarelo os compostos discriminantes.	165
Figura 5.60	Cromatograma e diagrama de caixa que indicam a predominância da triheptilamina em dadores do género feminino.	166
Figura 5.61	Cromatograma e espectro de massa da 16- α -(metiltio)progesterona.	166
Figura 5.62	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos fenilalanina e serina nos diferentes grupos de género e etários.	171
Figura 5.63	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos alanina e prolina nos diferentes grupos de género e etários.	171
Figura 5.64	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos ornitina e tirosina nos diferentes grupos de género e etários.	172
Figura 5.65	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos valina e isoleucina nos diferentes grupos de género e etários.	172
Figura 5.66	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos asparagina e lisina nos diferentes grupos de género e etários.	173
Figura 5.67	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos histidina e ácido glutâmico nos diferentes grupos de género e etários.	173
Figura 5.68	Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos arginina e aspartato nos diferentes grupos de género e etários.	174
Figura 5.69	Volcano plot com um p-value de 0.05 e Log2 Fold Change de 1 para os grupos F-G4 e F-G5.	175
Figura 5.70	Diagramas de caixa representativos da abundância do (9S,10S)-9,10-dihidroioctadecanoato.	178

Figura 5.71 Diagramas de caixa representativos da abundância do 3 α , 5 α -cholestan-3-amina.	179
Figura 5.72 Gráfico representativo da abundância do ácido salicílico nos diferentes grupos de gênero e etários.....	180
Figura 5.73 Gráfico representativo da abundância da esfinganina nos vários grupos de estudo.	182
Figura 5.74 Diagramas de caixa representativos da abundância do ácido abscísico.	185
Figura 5.75 Espectro de massa MS ² da cocaína.....	186
Figura 5.76 Esquema ilustrativo do metabolismo da cocaína que dá origem aos principais metabolitos [341].....	187
Figura 5.77 Espectro de massa MS ² do ácido canabidiólico.	188
Figura 5.78 Esquema representativo da descarboxilação do ácido canabidiólico [342].....	188
Figura 5.79 Espectro de massa MS ² da nicotina.	189
Figura 5.80 Espectro de massa da dihidroceramida C2.	191
Figura 5.81 Síntese e transferência de ceramidas [344].....	191

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 Compostos identificados em vestígios de impressões digitais com origem nas glândulas écrinas e sebáceas.	45
Tabela 3.2 Técnicas analíticas utilizadas na deteção/quantificação de compostos constituintes de vestígios de impressões digitais [81].	46
Tabela 4.1 Timeline da evolução da Espectrometria de massa.	63
Tabela 4.2 Tipos de analisadores de massa [175].	70
Tabela 5.1 Identificação dos vestígios dermopapilares constituintes deste grupo de estudo.	87
Tabela 5.2 Ácidos gordos (FA) identificados nos vestígios de impressões digitais analisados.	94
Tabela 5.3 Prenóis (PR) identificados nos vestígios de impressões digitais analisados.	95
Tabela 5.4 Glicerofosfolípidos detetados nos vestígios de impressões digitais analisados. ..	99
Tabela 5.5 Lípidos esteróis (ST) detetados nos vestígios de impressões digitais analisados.	102
Tabela 5.6 Iões detetados em vestígios de impressão digital sendo atribuídos à subclasse de lípidos PK.	106
Tabela 5.7 Iões detetados em vestígios de impressão digital atribuídos a lípidos das sub-classes SP e GL.	108
Tabela 5.8 Espécies químicas apenas existentes nos vestígios de dadores do género feminino.	113
Tabela 5.9 Espécies químicas apenas existentes nos vestígios de dadores do género masculino.	113
Tabela 5.10 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 1 do TATP.	118
Tabela 5.11 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 2 do TATP.	119
Tabela 5.12 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 3 do TATP.	120
Tabela 5.13 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 4 do TATP.	121
Tabela 5.14 Descrição da população de estudo.	129
Tabela 5.15 Listagem de iões positivos detetados nas impressões digitais latentes em estudo.	138
Tabela 5.16 Listagem de iões negativos detetados nas impressões digitais latentes em estudo.	139

Tabela 5.17 Alguns dos compostos detetados em todos os dias de aposição dos vestígios, com desvio inferior a 1,5 ppm.....	157
Tabela 5.18 Compostos discriminantes de género.	165
Tabela 5.19 Lista de compostos com predominância no género feminino.	167
Tabela 5.20 Lista de compostos com predominância no género masculino.	168
Tabela 5.21 Compostos com maior predominância no Grupo F-G1.	176
Tabela 5.22 Compostos com maior predominância no Grupo F-G2.	177
Tabela 5.23 Compostos com maior predominância no Grupo F-G3.	179
Tabela 5.24 Compostos com maior predominância no Grupo F-G8.	181
Tabela 5.25 Compostos com maior predominância no Grupo M-G1.	181
Tabela 5.26 Compostos com maior predominância no Grupo M-G2.	182
Tabela 5.27 Compostos com maior predominância no Grupo M-G3.	183
Tabela 5.28 Compostos com maior predominância no Grupo M-G4.	183
Tabela 5.29 Compostos com maior predominância no Grupo M-G5.	184
Tabela 5.30 Compostos com maior predominância no Grupo M-G6.	184
Tabela 5.31 Compostos com maior predominância no Grupo M-G7.	184

LISTA DE SÍMBOLOS, UNIDADES E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
AFIS	Sistema automático de identificação de impressões digitais, do inglês <i>Automatic Fingerprint Identification System</i>
Ala, A	L-Alanina
AMP	Monofosfato de adenosina
APCI	Ionização química à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
APPI	Fotoionização à pressão atmosférica, do inglês <i>Atmospheric Pressure Photoionization</i>
Arg, R	Arginina
Asn, N	Asparagina
Asp, D	Aspartato
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR-FTIR	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada, do inglês <i>Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
BIRD	Radiação infravermelha de corpo negro, do inglês <i>Blackbody Infrared Radiative Dissociation</i>
BY40	Amarelo básico 40, do inglês <i>Basic Yellow 40</i>
BY40 SPR	Reagente de pequenas partículas de amarelo básico 40, do inglês <i>Basic Yellow 40 Small Particles Reagent</i>
C4	Explosivo plástico (91% RDX e 9% de aditivos plastificantes)
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês <i>Collision induced dissociation</i>
Cys, C	Cisteína
D	diâmetro
DART	Análise directa em tempo real, do inglês <i>Direct Analysis in Real Time</i>
DESI	Ionização por electropulverização por desorção, do inglês <i>Desorption Electrospray Ionization</i>
DFO	1,8-diaza-fluoren-9-ona

ECD	Dissociação por captura de electrões, do inglês <i>Electron Capture Dissociation</i>
ESI	Ionização por electrospray, do inglês <i>Electrospray Ionization</i>
ETD	Dissociação por transferência de electrão, do inglês <i>Electron Transfer Dissociation</i>
EthcD	Transferência electrónica e de dissociação colisão de maior energia, do inglês <i>Electron-transfer/higher-energy collision dissociation</i>
F	Feminino
FA	Ácidos gordos
FAB	Bombardeamento de átomos rápidos, do inglês <i>Fast Atom Bombardment</i>
FID	Decaimento de indução livre, do inglês <i>Free Induction Decay</i>
FT	Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform</i>
FT-ICR	Ressonância ciclotrónica de ião por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry</i>
FTIR	Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>
FT-MS	Espectrometria de massa com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Mass Spectrometry</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, do inglês <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
GL	Glicerolípidos
Gln, Q	Glutamina
Glu, E	Glutamato
Gly, G	Glicina
GP	Glirerofosfolípidos
HCD	Dissociação por colisão de alta-energia, do inglês <i>Higher-energy Collisional Dissociation</i>
HILIC	Cromatografia líquida com interação hidrofílica, do inglês <i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
His, H	Histidina
HMDB	Base de dados do metaboloma humano, do inglês <i>Human Metabolome Database</i>

HMX	Explosivo com elevado ponto de fusão, do inglês <i>High Melting point eXplosive</i> (ciclotetrametileno-tetranitramina)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HR-MS	Espectrometria de massa de alta resolução, do inglês <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
INTERPOL	Organização internacional de polícia criminal, do inglês <i>International Criminal Police Organization</i>
Ile, I	Isoleucina
IRMPD	Dissociação de múltiplos fótons por infravermelho, do inglês <i>Infrared multiphoton dissociation</i>
IV	Radiação infra-vermelho
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, do inglês <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
Leu, L	Leucina
LHRH	Hormona libertadora da hormona luteinizante, do inglês <i>Human luteinizing hormone, realising hormone</i>
LIBS	Espectroscopia de decomposição induzida por laser, do inglês <i>Laser-induced breakdown spectroscopy</i>
Lys, K	Lisina
M	Masculino
MALDI	Dessorção/ionização a laser assistida por matriz, do inglês <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MALDI-ToF	dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador de tempo de voo, do inglês <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time of flight</i>
Met, M	Metionina
MMD	Deposição multimetal, do inglês <i>Multi Metal deposition</i>
MS	Espectrometria de massa, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
MSI	Imagiologia por espectrometria de massa, do inglês <i>Mass Spectrometry Imaging</i>
MS ⁿ	Espectrometria de massa <i>tandem</i>
m/z	Razão massa carga

NP-LC	Cromatografia líquida de fase normal, do inglês <i>Normal Phase Liquid Chromatography</i>
p.a.	Pró-análise (utilizado para denominação de reagentes de alto grau de pureza)
PC	Fosfatidilcolina
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component analysis</i>
PC's	Componentes principais, do inglês <i>Principal Components</i>
PETN	Tetranitrato de pentaeritrina
PGE	Prostagladina E1
Phe, F	Fenilalanina
PK	Policétidos
PLS	Regressão com mínimos quadrados parciais, do inglês <i>Partial Least Square</i>
PLS – DA	PLS com Análise por Discriminação, do inglês <i>PLS Discriminant Analysis</i>
PR	Prenóis
Pro, P	Prolina
QQQ	Triplo quadrupolo
RDX	<i>Research Department X</i> (ciclotrimetilenotrinitramina)
RF	Radiofrequência
RP-LC	Cromatografia líquida de fase reversa, do inglês <i>Reverse Phase Liquid Chromatography</i>
SALDI-ToF	Ionização/dessorção a laser assistida por superfície com analisador de tempo de voo, do inglês <i>Surface-assisted laser desorption/ionization – Time of Flight</i>
Ser, S	Serina
SM	Esfingomielina, do inglês <i>Sphingomielin</i>
SORI-CID	Dissociação induzida por colisão por irradiação por ressonância sustentada, do inglês <i>Sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation</i>
SP	Esfingolípidos, do inglês <i>Sphingolipids</i>
ST	Lípidos esteróis, do inglês <i>Sterols Lipids</i>
TATP	Triacetona triperóxido, do inglês <i>triacetone triperoxide</i>
Th	Thomson

Thr, T	Treonina
TLC	Cromatografia em Camada Fina, do inglês <i>Thin Layer Chromatography</i>
ToF	Analisador por tempo de voo, do inglês <i>Time of Flight</i>
ToF-SIMS	Espectrometria de massa de iões secundários com tempo de voo, do inglês <i>Time of Flight Secondary Ions Mass Spectrometry</i>
Trp, W	Triptofano
Tyr, Y	Tirosina
u	Unidade de massa atômica
UV	Radiação ultra-violeta
UVPD	Fotodissociação por ultravioleta, do inglês <i>Ultraviolet Photodissociation</i>
Val, V	Valina
VIP	Importância da Variável na projeção, do inglês <i>Variable Importance in Projection</i>
z	Carga
ϵ_0	Permissividade do meio
γ	Tensão superficial
μ -FTIR	Micro - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Microspectrometry</i>

Capítulo 1

O Processo de Identificação

1.1 A evolução do uso das impressões digitais

1.2 Valor Probatório

1.3 Lofoscopia

1.3.1 Tipos de Impressões Digitais

1.3.2 Técnicas de detecção

1.3.2.1 Superfícies não porosas

1.3.2.2 Superfícies porosas

1.3.2.3 Superfícies semi-porosas

1.3.3 Classificação de impressões digitais

1 O PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO

Ao longo dos tempos, o relacionamento interpessoal das sociedades e dos seus elementos, conduziu à necessidade da determinação, individualização e registo de características que permitissem a distinção clara e inequívoca dos seus indivíduos. Para tal, diversas metodologias foram utilizadas, desde o simples uso de medalhas ao pescoço, até à utilização de anéis ou mesmo tatuagens.

Sendo a identidade um conjunto de características que individualizam um ser humano, tornou-se notória e evidente a necessidade do estabelecimento de um processo para a sua determinação, o qual se denominou identificação [1]. A identificação sofreu desenvolvimentos associados à evolução da sociedade e do conhecimento científico e tecnológico. Ao longo dos tempos a necessidade específica relativa à identificação de criminosos levou à utilização de métodos rudimentares dos quais se destacam o ferrete (marca feita com ferro em brasa) e a mutilação (amputação de uma parte do corpo) como alguns dos primeiros processos a serem utilizados [2].

Em 1838, a fotografia aparece, pelas mãos de Jacques Daguerre, como forma de identificar indivíduos, sendo a Polícia de São Francisco nos Estados Unidos a primeira a adotar este processo. Como em qualquer processo evolutivo, foram os erros e falhas do anterior sistema que levaram ao surgimento do primeiro processo científico de identificação - o Sistema Antropométrico de Bertillon, divulgado em Paris em 1882 e usado em quase todo o mundo até 1914. Alphonse Bertillon tinha apenas 26 anos quando pensou aplicar à identificação criminal os processos da antropologia.

Neste processo antropométrico descritivo eram efetuadas inúmeras medidas do esqueleto humano e caracterizados sinais particulares: estatura, altura do tronco, comprimento e largura da cabeça, comprimento da orelha direita, comprimento do pé esquerdo, cor do cabelo, da pele e dos olhos, barba, nariz, entre outras [3]. Este sistema só desapareceu com a introdução do processo de identificação através das impressões digitais [2],[4]–[6].

1.1 A EVOLUÇÃO DO USO DAS IMPRESSÕES DIGITAIS

As impressões digitais são figuras compostas por cristas e sulcos dispostas em grafismos particulares que aparecem na pele da palma e dos dedos das mãos e pés e são características únicas de cada indivíduo. Esta filigrana epidérmica tem sido utilizada desde os tempos pré-históricos, no entanto as primeiras evidências escritas da sua utilização na identificação humana remontam à Dinastia Qin (221 a 206 a.C.) na China.

A superfície da pele foi estudada por diversos cientistas do século XVII dos quais se destaca Marcello Malpighi, professor catedrático de Anatomia da Universidade de Bolonha. Pioneiro no uso do microscópio, Malpighi verificou que a rugosidade da pele aumentava o atrito entre um objeto e a superfície daquele órgão. Estudos diversos levaram ao seu reconhecimento, sendo atribuído o seu nome a uma das cinco camadas da epiderme, a camada espinhosa de Malpighi. Em 1823, João Evangelista Purkingi estudou a porosidade e características exteriores da pele, classificando os desenhos digitais em nove tipos fundamentais, tornando-se o fundador da Dactiloscopia Científica. Já em 1880, o médico britânico Henry Faulds, propôs o uso da individualização das cristas papilares em cenas de crime num artigo publicado na revista Nature. Sir Francis Galton foi responsável por estudos diversos na área das impressões digitais. Estabeleceu o conceito de que a rugosidade da pele é única e persistente, classificando os padrões dermocapilares em três grupos principais: arcos, presilhas e vertículos. Foi o autor do primeiro livro sobre impressões digitais ("*Finger Prints*") - ver Figura 1.1, publicado em 1892.

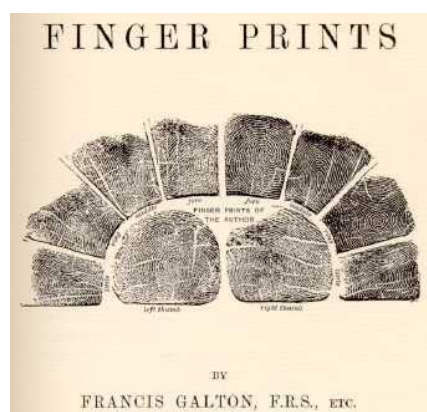


Figura 1.1 Capa do livro *Finger Prints* de Sir Francis Galton [7].

Vários outros cientistas prosseguiram e aperfeiçoaram os estudos de Galton. Em 1891, Juan Vucetich do Departamento Central de Polícia em La Plata (Argentina) introduziu um sistema de classificação e individualização dos prisioneiros que foi rapidamente adotado por outros países.

Foi também na Argentina, mais especificamente em Buenos Aires, que em 1892 acontece o famoso homicídio Rojas. Os dois filhos de Francisca Rojas foram encontrados mortos, sendo que esta apresentava um ferimento na garganta. Rojas acusou um homem de nome Velasquez do homicídio, referindo que este teria ciúmes por ela se recusar a casar com ele, visto estar apaixonada por outro homem. As autoridades locais espancaram brutalmente Velasquez esperando por uma confissão, a qual não aconteceu. Quando Velasquez não confessou o crime, o inspetor Eduardo Alvarez, vindo de La Plata, realiza uma investigação mais profunda. Começando por examinar a cena de crime, encontrou uma impressão digital de um dedo polegar ensanguentado na porta. Tendo sido treinado por Juan Vucetich na comparação de impressões digitais, Alvarez removeu a secção da porta comparando a impressão do polegar com sangue com a impressão do polegar de Francisca Rojas. Quando confrontada com esta situação, acabou por confessar o crime [2]. O caso do homicídio Rojas foi assim considerado o primeiro crime a ser resolvido com base em vestígios de impressões digitais.

A investigação no âmbito das impressões digitais continua um pouco por todo o mundo. Em 1914, Edmond Locard publica “The Legal Evidence by the Fingerprints”. Na altura, Locard era o diretor do Laboratório de Polícia em Lyon (França) e aluno de Alphonse Bertillon. Nesta publicação, o autor explica a teoria da poroscopia, e como o uso dos poros pode contribuir para a comparação da impressão digital.

Em Portugal, o primeiro boletim antropométrico com referência a impressões digitais e palmares de um suspeito surge em 1902 no Posto Antropométrico do Porto. Neste mesmo ano os serviços de identificação criminal foram também organizados em Lisboa com base no sistema de Bertillon. A 5 de Julho de 1904 a Dactiloscopia torna-se oficial em Portugal. Dois anos depois, foi determinada a reforma dos postos antropométricos, dando lugar aos sistemas dactiloscópico de Galton-Henry e antropométrico de Bertillon – ver Figura 1.2.

1 O Processo de Identificação



Figura 1.2 Instrumentos e informação usados para aplicação do sistema de Bertillon do Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária.

Em 1904, Xavier da Silva, considerado o introdutor da Polícia Científica em Portugal, e Leonel da Silva, dactiloscopista no Posto de Lisboa, identificaram um cadáver desconhecido através das impressões digitais, tendo sido a primeira identificação desta natureza na Europa.

A identificação de um criminoso através das impressões digitais deixadas acidentalmente no local do crime (também denominadas impressões latentes) foi realizada pela primeira vez em 1911 por estes mesmos dois investigadores, como é relatado no relatório original [5]:

“CONCLUSÃO – Trabalhando desde o século sétimo com impressões digitais, embora só desde mil oitocentos e cinquenta e oito, com Sir William J. Herschel, delas se começam a tirar conclusões categóricas que tomam foros de científicas, como os estudos de Galton; tendo-se provado que, até hoje, não se deparou com duas dedadas iguais; porque a disposição das linhas papilares das últimas falanges digitais é constante; sendo a dedada da figura B, tirada ao detido Justo César Cortez, igual à da figura A, revelada na caneca que encontrei na loja número dezanove do Largo da Saúde; concluo e afirmo, baseando-me não nos meus humildes trabalhos, mas no brilhantíssimo estudo dos mestres mundiais que o basearam na observação de milhões de dedos, que a impressão digital revelada na caneca pertence ao dedo polegar esquerdo do espanhol Justo César Cortez, embora ele negue terminantemente ser um dos criminosos – Lisboa, três de Junho de mil novecentos e onze. (a) Rodolfo Xavier da Silva.”.

A importância histórica desta perícia mereceu o reconhecimento de Locard mencionando-a no seu monumental trabalho, o *Traité de Criminalistique*.

Em 1913, com o Ministro da Justiça Álvaro de Castro, inicia-se a criação de um bilhete de identidade – ver Figura 1.3, no entanto, a sua utilização só foi amplamente alargada em 1926.

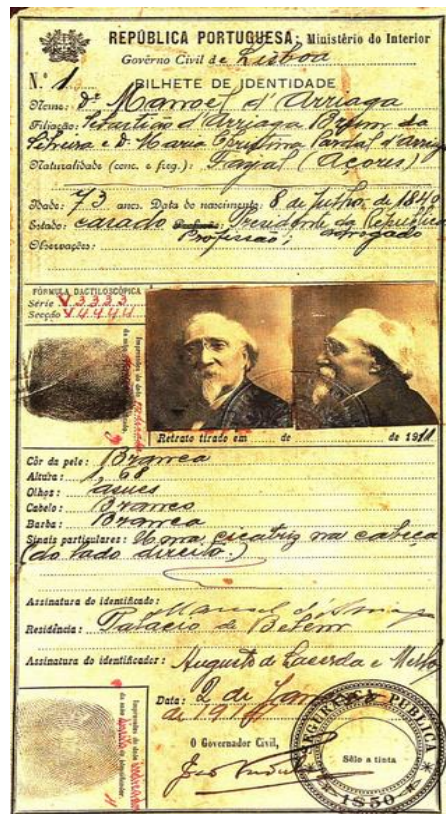


Figura 1.3 Primeira página do primeiro Bilhete de Identidade Português, emitido em 1914, e pertencente ao então Presidente da República, Manoel d'Arriaga.

Em paralelo a estas medidas começam a efetuar-se cursos práticos desta matéria lecionados nos Institutos de Criminologia de Lisboa e de Coimbra, e na Repartição de Antropologia Criminal do Porto [5].

Entretanto, ainda no ano de 1910, em Espanha, Olóriz de Aguilera cria um novo sistema de classificação e arquivo das impressões digitais com o intuito de permitir a sua identificação nos locais do crime. Este novo sistema baseado no sistema de Vucetich é introduzido em Portugal em 1957, nos serviços de Identificação Judiciária da Polícia Judiciária pelo Comissário de Polícia Florentino Santamaria [5].

Muitos outros investigadores e cientistas tiveram um papel proeminente na pesquisa e no desenvolvimento da teoria que tornou as impressões digitais um meio inequívoco de individualização e uma ferramenta forense de valor incalculável.

1.2 VALOR PROBATÓRIO DAS IMPRESSÕES DIGITAIS NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO

O padrão de linhas visíveis da impressão digital é único e individual para cada dedo e palma - Princípio da Diversidade. Este padrão é formado de forma acidental durante a gestação e permanece até à decomposição após a morte – Princípio da Perenidade. As células da pele estão em constante regeneração e crescimento. Estas migram para a superfície como resultado do processo de queratinização, sendo que em aproximadamente trinta dias são células mortas. Por esta altura um novo ciclo já está em progressão. O resultado é a perenidade das cristas papilares. Durante esta permanência, os desenhos dermopapilares não sofrem modificações – Princípio da Imutabilidade [5][6].

Sir William James Herschel, em 1880, publicou uma carta na revista *Nature*, explicando as suas experiências com impressões digitais. Em 1916, um ano antes da sua morte, publicou um relato do seu trabalho intitulado "A Origem da Impressão Digital". Tirando impressões do seu dedo indicador direito em junho de 1859 e novamente em novembro de 1913 (Figura 1.4) estabeleceu que os arranjos das cristas não se alteravam ao longo do tempo, o que era uma prova inequívoca da persistência das mesmas.

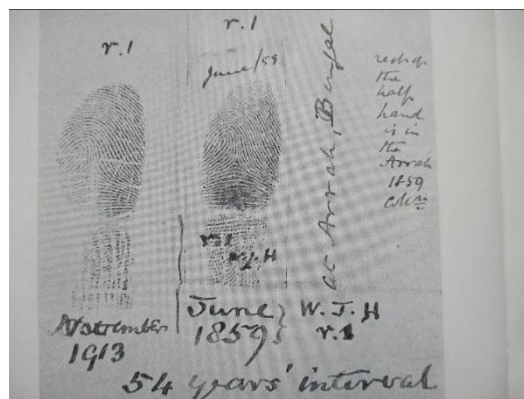


Figura 1.4 Impressões digitais recolhidas por Herschel em 1859 e 1913 incluídas no seu livro “A origem da impressão digital” presentemente na posse da Slough Library.

Em determinadas situações podem ser observadas alterações das cristas papilares a vários níveis, permanentes ou temporárias, decorrentes de lesão ou doença. Em lesões mais profundas, a destruição parcial ou total impossibilita a recuperação dermo-epidérmica. Noutras ainda poderá fazer-se uma classificação geral, embora não seja possível a verificação de determinadas particularidades. De referir ainda a existência de uma patologia rara denominada síndrome de Nagali cujos portadores não possuem impressões digitais.

Desde 1920, com a aceitação a nível internacional do Princípio de Locard que refere que “qualquer contacto deixa um vestígio”, que o recurso às ciências forenses como elemento de prova de um crime tem sido um elemento crucial nos sistemas de justiça. Através do contacto com uma superfície, o grafismo resultante das formações papilares deixa uma impressão que pode ser analisada, comparada e avaliada, de forma a conduzir a uma individualização ou exclusão de identidade. Com a aceitação deste meio de prova pelos diferentes sistemas judiciais e com a evolução tecnológica a nível informático e eletrónico, introduziram-se nos anos 80 sistemas automatizados de pesquisa e comparação de impressões digitais, os chamados AFIS: *Automatic Fingerprint Identification System*.

As impressões digitais continuam a ter cada vez mais um papel crucial na investigação criminal, seja na identificação ou ilibação do suspeito, no relacionamento de vários crimes, ou na “introdução” de um suspeito no local do crime. Para além de serem fundamentais a nível criminal, as impressões digitais têm grande importância na identificação de vítimas resultantes de catástrofes como terremotos, ataques bombistas, entre outros.

Em outubro de 2015, a base de dados de impressões digitais da Interpol – *International Criminal Police Organization* – contava com mais de 233 000 registos de impressões digitais. Neste modelo de base de dados automatizada foram introduzidos em 2010 novas potencialidades de comparação e pesquisa, não só nas bases de dados internas de cada país mas também na base de dados internacional, possibilitando uma pesquisa de 1000 registos por dia [8]. Em Portugal, o Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária é a entidade responsável pela gestão desta *network* internacional do sistema AFIS.

1.3 LOFOSCOPIA

Lofoscopia é o termo comum e universal para exprimir o estudo das impressões digitais. Da raiz grega *lophos*, que significa “crista” ou “crista”, e *skopein*, que significa “estudo” ou “exame”, o termo lofoscopia foi proposto por Lambert em 1990. Trata-se assim da ciência que estuda os desenhos dermopapilares formados nas zonas de fricção da pele – desenhos dermopapilares dos dedos (Dactiloscopia), palmas das mãos (Quiroscopia) e plantas dos pés (Pelmatoscopia).

1.3.1 Tipos de impressões digitais

Existem duas categorias gerais para descrever as evidências digitais que podem ser encontradas numa cena de crime ou num contexto criminal: impressões visíveis e impressões latentes – ver Figura 1.5. Estas categorias não são mutuamente exclusivas, pois um item ou superfície pode conter marcas visíveis e latentes. Qualquer busca por evidências de impressões digitais deve levar em consideração a possível presença de ambos os tipos de marcas.

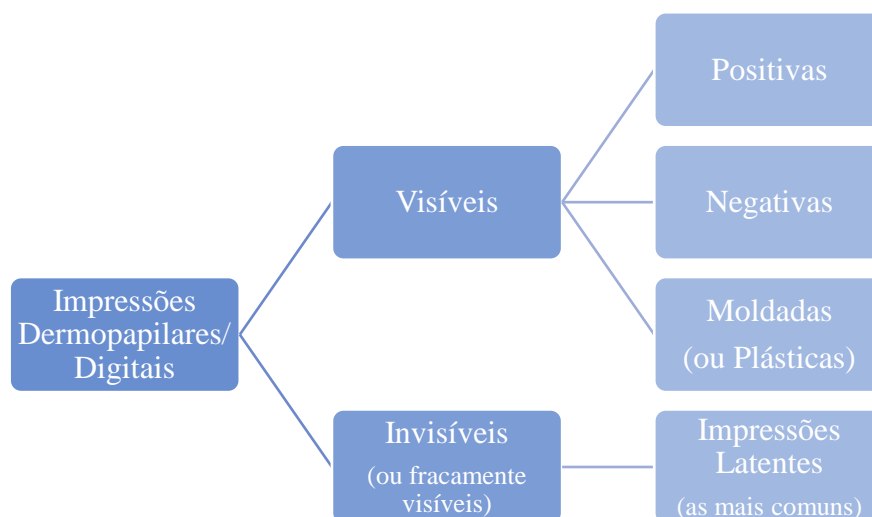


Figura 1.5 Classificação dos tipos de impressões dermopapilares.

As impressões visíveis, como o termo indica, são visíveis sem tratamento específico, podendo ser classificadas como negativas, positivas ou moldadas. As negativas são impressões que removem material da superfície (por exemplo, fuligem ou pó), enquanto as positivas se formam quando as cristas papilares da pele que originam a impressão estão contaminadas por uma substância colorida ou opaca (como sejam tintas, sangue ou resíduos diversos) a qual é deixada na superfície. Já as impressões moldadas são formadas pelo contacto da pele com uma substância maleável (cera, tinta fresca, cremes ou pomadas, entre outras) que por consequência retêm uma imagem tridimensional da impressão – ver Figura 1.6.

Por outro lado, as impressões latentes são invisíveis (ou fracamente visíveis) à luz direta. Originam-se pela deposição dos resíduos da transpiração quando a pele toca numa superfície.

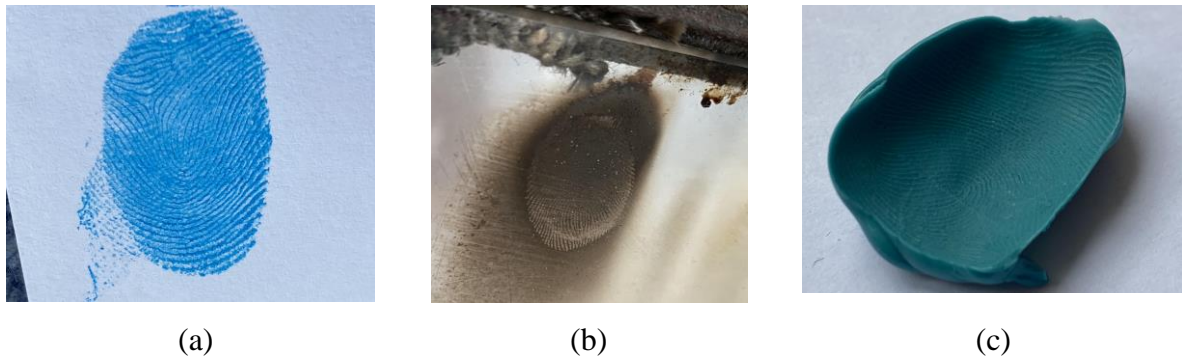


Figura 1.6 Vestígios de impressões digitais tintada (a), por aposição em fuligem (b) e moldada (c), ampliadas 2x e obtidas com iluminação natural.

Em suma, a impressão dermopapilar é visível desde que haja contraste suficiente entre a marca e o seu suporte, podendo, no entanto, ser necessário usar iluminação colorida ou oblíqua para observar marcas fracamente visíveis – ver Figura 1.7.



Figura 1.7 Vestígio de uma impressão digital latente aposta numa superfície de alumínio, ampliada 3x e obtida com iluminação natural.

A impressão latente é a forma mais comum de evidência de impressão digital e também a que apresenta mais problemas: está presente, mas de forma invisível. A aplicação de um tratamento ótico (por exemplo, UV), físico (por exemplo, pó) ou químico (por exemplo, ninidrina) é necessária para visualizar uma impressão latente. É nestas situações que um conhecimento detalhado das secreções humanas e do ambiente em que as amostras foram armazenadas é essencial para selecionar as melhores técnicas para a revelação e estudo das impressões digitais. É interessante notar que certas técnicas de deteção, ainda hoje válidas, foram originalmente propostas para o estudo de fluidos e secreções de transpiração antes que as impressões digitais fossem usadas para identificação pessoal. Aubert (1877-1878), por exemplo, já havia publicado em 1878, a reação entre sais alcalinos no suor e nitrato de prata e a absorção do vapor de iodo pelas secreções sebáceas[9],[10].

1.3.2 Técnicas de Deteção

Conforme referido, as impressões latentes são fracamente visíveis ou mesmo invisíveis, sendo por tal sujeitas a processos físico-químicos de revelação, os quais permitem uma visualização facilitada, possibilitando o posterior estudo das mesmas.

Os substratos – superfícies onde são apostas as impressões digitais - podem ser classificados em três tipos, com base na sua capacidade de absorver depósitos solúveis em água: superfícies porosas (por exemplo, o papel), superfícies não porosas (o vidro é o exemplo) e superfícies semi-porosas (como exemplo, a madeira) [10].

Impressões digitais em superfícies porosas podem ser reveladas usando:

- a) ninidrina e seus análogos [3],[11],[12];
- b) diazaflurenona (DFO) [13],[14];
- c) reveladores físicos (PD) [14],[15];
- d) deposição multimetal (MMD) [16]–[18].

Impressões digitais em superfícies não porosas podem ser reveladas usando:

- a) pós de impressão digital [18]–[20];
- b) reagente de pequenas partículas [21]–[23];
- c) fumigação por cianoacrilato [24];
- d) deposição de metais a vácuo (VMD) [25]–[27].

Impressões digitais em superfícies semi-porosas podem ser reveladas usando:

- a) pós de impressão digital [18]–[20];
- b) fumigação por cianoacrilato [24].

1.3.2.1 Técnicas de detecção para superfícies porosas

a) Ninidrina

As glândulas écrinas segregam diversos aminoácidos que podem estar presentes numa impressão latente. A ninidrina reage aos aminoácidos de forma inespecífica, ou seja, tem reação igual para diferentes aminoácidos, ou seja, reage com o grupo o α -amina. Numa amostra biológica a maior parte dos grupos α -amina estão nos aminoácidos. Desta forma, todos os aminoácidos presentes na impressão latente contribuirão para a imagem da impressão digital revelada. Os aminoácidos são compostos estáveis que, devido a uma afinidade com a celulose, não migram de forma significativa através de substratos de papel seco.

A ninidrina reage com aminas primárias e secundárias (incluindo aminoácidos, proteínas e peptídeos) formando um produto de coloração roxo escuro conhecido como Roxo de Ruhemann

– ver Figura 1.8. Como o componente écrino de uma impressão latente contém aminoácidos, esta reação pode ser usada como um meio de revelar marcas de impressões digitais em superfícies porosas, como papel e papelão.

A concentração de aminoácidos e proteínas é extremamente importante na visualização de impressões latentes com ninidrina (2,2-dihidroxi-1*H*-indeno-1,3(2*H*)-diona), sendo que a quantidade de aminoácidos presente numa impressão varia entre 0,3 e 2,59 mg/L [28]. O primeiro aminoácido encontrado no suor écrino foi a serina, isolada como β-naftalinosulfoserina recorrendo a um método microbiológico, como Embden and Tachau descreveram em 1910 [29]. A serina foi o aminoácido mais abundante identificado, seguido pela glicina, alanina e ácido aspártico [30]. Diferenças quantitativas significativas entre amostras de impressão digital "natural" e "preparada" observadas para ácidos gordos não foram observadas no caso dos aminoácidos [31],[32].

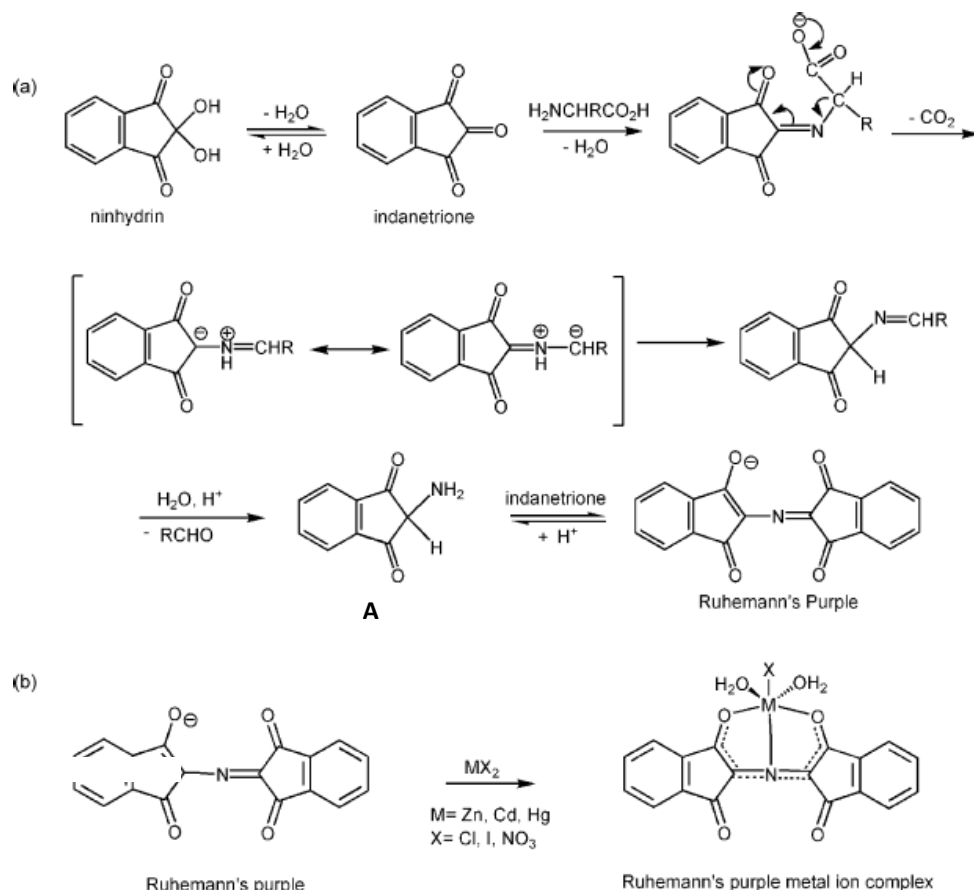


Figura 1.8 (a) Mecanismo de reação da ninidrina com aminoácidos para formar o Roxo de Ruhemann (b) Reação do Roxo de Ruhemann com sais de metal para formar um ião complexo [30].

A reação mais documentada envolve uma degradação de Strecker, em que a redução de uma carbonil-indanotriona forma 2-amino-1,3-indanodiona (A no esquema (a) da Figura 1.8) por meio de uma azometinilida estabilizada por ressonância. A 2-amino-1,3-indanodiona pode então reagir com outra molécula de indanotriona para formar o 1,3-dipolo estável de Roxo de Ruhemann.

A ninidrina reage na sua forma de tricetona para produzir uma imina intermediária. A descarboxilação subsequente fornece uma amina que reage com uma segunda molécula de ninidrina para produzir o Roxo de Ruhemann. Devido a este mecanismo complexo, as condições da reação devem ser rigorosamente controladas para obter o rendimento ideal do Roxo de Ruhemann. A taxa de reação dependerá da temperatura, humidade relativa e pH (acidez).

O uso da ninidrina como reagente de deteção de impressões digitais foi proposto pela primeira vez em 1954 por Odén e Von Hofsten. Desde então, a ninidrina tornou-se a técnica mais popular para a deteção de impressões digitais em substratos porosos. Impressões latentes muito antigas podem ser reveladas com ninidrina, sendo as mesmas normalmente de boa qualidade, o que já possibilitou a revelação de impressões digitais com 40 anos. Além disso, a composição de aminoácidos da secreção écrina parece permanecer relativamente constante ao longo do tempo. Devido a estas características, o uso de reagentes de aminoácidos (ninidrina e análogos da ninidrina, incluindo o 1,8-diazafluoren-9-ona [DFO]) constitui uma técnica química eficaz para a revelação de impressões latentes nas superfícies de papel.

Análogos da ninidrina são reagentes específicos de aminoácidos estruturalmente semelhantes à própria ninidrina, mas onde diferentes grupos funcionais foram introduzidos com o objetivo de melhorar os recursos de deteção das impressões digitais [33],[34]. O primeiro análogo da ninidrina foi sintetizado por Ruhemann na tentativa de preparar um composto com maior solubilidade em solventes orgânicos [35].

As diferentes características espectrais das impressões reveladas com esses compostos também permitem melhor seletividade em certas superfícies onde há interferência com a ninidrina.

b) Diazafluorenona (DFO)

O composto 1,8-diaza-fluoren-9-ona (DFO) – Figura 1.9, é um reagente sensível a aminoácidos que fornece um produto de reação de cor púrpura pálida.

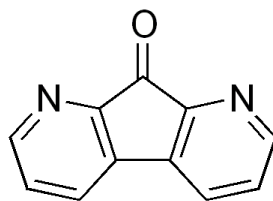


Figura 1.9 Estrutura molecular da 1,8-diaza-fluoren-9-ona (DFO).

A vantagem deste reagente é que, sem nenhum tratamento secundário, as marcas desenvolvidas mostram uma forte luminescência à temperatura ambiente [36]. A excitação com luz a aproximadamente 470 nm resulta numa emissão a aproximadamente 570 nm. Para uma revelação máxima das impressões digitais, recomenda-se que as amostras sejam aquecidas a 100°C na ausência de humidade. A reação química aparenta ter semelhanças com a reação entre a ninidrina e os aminoácidos presentes nas impressões digitais. Grigg e a sua equipa caracterizaram vários intermediários da reação e propuseram um mecanismo de reação [10]. O produto final da reação proposto por este grupo foi caracterizado por cristalografia de raios-X [37] – ver Figura 1.10.

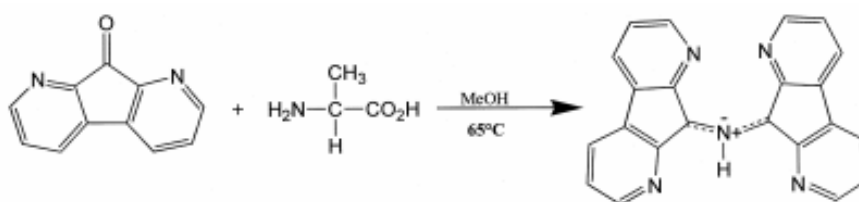


Figura 1.10 Reação sugerida entre DFO e o aminoácido L-alanina para produzir um produto luminescente [37].

c) Revelador Físico

O revelador físico é uma técnica de processamento de impressões digitais para superfícies porosas que foi desenvolvida na década de 70 do século XX pelo *Atomic Weapons Research Establishment* (AWRE) sob contrato com o Departamento de Desenvolvimento Científico da Polícia (PSDB), no Reino Unido [9],[38]. A técnica é sensível aos componentes insolúveis em água das impressões latentes e, portanto, o revelador físico pode ser eficaz mesmo se a superfície estiver molhada. As impressões reveladas por este método são visíveis em imagens cinza escuro a preto devido à deposição de prata nos sulcos de impressão. O revelador físico,

baseia-se no revelador físico usado em fotografia. Trata-se de uma solução aquosa contendo íons de prata, um sistema redox ferroso/férrico (redução/oxidação), uma solução tampão (ácido cítrico) e um surfactante catiónico (geralmente acetato de n-dodecilamina). Os íons ferrosos (Fe^{2+}) em solução reduzem os íons prata (Ag^+) a prata metálica ($\text{Ag}_{(s)}$), com íons férricos (Fe^{3+}) presentes para controlar a reação. O ácido cítrico é necessário para complexar com os íons férricos e manter um pH baixo, enquanto que o surfactante inibe a deposição prematura da prata metálica, capturando partículas de prata produzidas aleatoriamente, à medida que são formadas, sob a forma de esferas carregadas positivamente, moléculas surfactantes conhecidas como micelas. As micelas repelem os íons positivos de prata em solução, bloqueando assim a formação de mais prata metálica [28]. A solução de revelador físico é, portanto, um delicado equilíbrio de íons ferroso, férrico e prata estabilizados pela presença de ácido cítrico e um surfactante. Quando um documento é colocado no revelador físico, a prata da solução deposita-se lentamente. Esta deposição é geralmente maior nas áreas contaminadas da superfície, como é o caso dos resíduos de impressões digitais. As marcas reveladas geralmente aparecem como imagens de cor cinza escuro num fundo cinza claro.

Alguns substratos de papel que possuem aglutinantes e enchimentos alcalinos reagem fortemente com o revelador físico. Pode realizar-se uma pré-lavagem ácida, normalmente usando uma solução de ácido maleico, para neutralizar papéis alcalinos e, assim, melhorar a revelação de marcas. Ao contrário da ninidrina e do DFO, o revelador físico é sensível a componentes na impressão latente que não são solúveis em água (secreções sebáceas ou materiais solúveis em água presos numa emulsão insolúvel em água). Em papel molhado ou papel que esteve molhado, o revelador físico é uma das poucas técnicas que permitem a revelação satisfatória de impressões latentes [39]. O revelador físico também pode ser usado como tratamento após a utilização de DFO ou ninidrina, se ambas as técnicas falharem em revelar impressões latentes em superfícies de papel que não foram molhadas. O revelador físico é complementar aos reagentes usados em aminoácidos podendo, portanto, revelar detalhes das cristas papilares não detetados por técnicas mais convencionais.

d) Deposição Multimetal

A deposição multimetal (MMD), desenvolvida em 1989 por Saunder, envolve um processo de duas etapas, sendo a primeira a imersão da impressão numa solução de ouro coloidal (em pH aproximadamente 2,7). O uso de ouro coloidal é uma técnica bioquímica para a deteção de

proteínas e péptidos. O ouro coloidal, constituído por partículas de ouro carregadas negativamente devido à adsorção de iões citrato, é preparado tratando uma solução de ácido tetracloroaurico (cloreto de ouro) com citrato de sódio e um detergente. As partículas de ouro coloidal aderem a aminoácidos, proteínas e péptidos [40]. A técnica de revelação de impressões digitais por deposição multimetal depende da afinidade das partículas de ouro para estas biomoléculas, presentes numa concentração bastante grande nos resíduos de suor. Assim sendo, as partículas de ouro coloidal com carga negativa são atraídas por resíduos orgânicos que contêm grupos positivos a pH baixo.

O ouro deposita-se assim em qualquer resíduo de impressão digital presente no substrato. Marcas fracas dificilmente serão visíveis nesta fase, no entanto, impressões mais fortes podem ter uma coloração rosa salmão pálida. O segundo passo envolve o tratamento das impressões digitais reveladas pelo processo de ouro coloidal com uma solução de revelador físico modificado. O ouro coloidal ligado fornece locais de nucleação em torno dos quais a prata da solução de revelador físico modificado precipita. Esta etapa amplia bastante a visibilidade das marcas tratadas que, após esta segunda fase, podem variar de cor, de cinza claro a quase preto. As partículas de ouro coloidal são produzidas pela redução do tetracloroaurato de hidrogénio (III), (comumente referido como ácido tetracloroaurico), por ação do ácido cítrico.



Ácido cítrico

Ácido 3-cetoglutárico

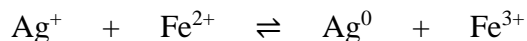
Os aniões citrato, fornecidos pelo citrato de sódio, envolvem as partículas de ouro coloidal, conferindo-lhes uma carga negativa. Os aminoácidos, ou os seus fragmentos em proteínas e péptidos, existem como zwitteriões (composto eletricamente neutro possuindo cargas opostas em átomos seus constituintes) em condições neutras. No entanto, sob condições ácidas, os aminoácidos adquirem uma carga global positiva.

Assim, as partículas coloidais de ouro possuem carga negativa e os aminoácidos carga positiva. A atração eletrostática entre as duas entidades químicas é responsável pela aderência das partículas de ouro aos aminoácidos, proteínas e péptidos dos resíduos de suor.

É importante referir que o ácido cítrico desempenha duas funções: reduz o ião tetracloroaurato de hidrogénio (III) em ouro coloidal e diminui o pH da solução para a faixa desejada.

As partículas de ouro adsorvidas no conteúdo de aminoácidos, proteínas e peptídeos do resíduo da impressão digital não conferem uma cor pronunciada às cristas. No entanto, fornecem um

local para a nucleação das partículas de prata que, por sua vez, são produzidas pela redução de iões prata por iões ferro (II).



Sendo uma reação reversível, há hipótese de que ela possa ocorrer da direita para a esquerda ou no sentido inverso. No entanto, os iões citrato complexam com iões ferro (III) removendo-os do sistema de equilíbrio, direcionando a reação no sentido direto.

As partículas de prata então depositam-se assim no ouro coloidal, conferindo uma cor cinza escura ou preta às cristas.

O ouro é evaporado sob vácuo para formar uma camada muito fina de metal (invisível a olho nu) na superfície examinada. Uma segunda camada de zinco é depositada da mesma maneira. Também é possível usar-se cádmio, embora tal seja menos comum devido à sua toxicidade. Um filme de ouro é depositado uniformemente na superfície da amostra, penetrando também na impressão digital. O zinco é depositado preferencialmente no ouro exposto, mas não penetra na impressão digital. As cristas são assim deixadas transparentes, enquanto o fundo fica revestido com uma camada de zinco. Com esta técnica podem obter-se impressões digitais de grande detalhe, sendo que os melhores resultados são geralmente obtidos em superfícies não porosas, como o plástico ou o vidro. No entanto, a grande eficácia desta técnica já permitiu a revelação de impressões digitais recentes (com menos de 48 horas) em tecido e notas.

Muitos tipos de superfícies - porosas ou não porosas, húmidas ou secas - podem ser tratados por esta técnica. Papel seco, papel húmido, plástico, vidro, poliestireno expandido ou ambos os lados de uma fita adesiva são bons exemplos disso. A revelação de impressões digitais em sangue também pode ser melhorada com esta técnica. Em 1992, Allman e os seus colaboradores descobriram que a deposição multimetal era promissora na revelação de impressões digitais em substratos não porosos que no passado se mostraram difíceis (por exemplo fita adesiva, rótulos de garrafas de cerveja e luvas de plástico). O processo de deposição multimetal já sofreu posteriormente otimizações para melhorar a sua sensibilidade e especificidade [41],[42].

1.3.2.2 Técnicas de Detecção para Superfícies não porosas

a) Pós de revelação

A técnica tradicional de detecção de impressões digitais para o tratamento de superfícies não porosas e lisas é a aplicação de pó. Os pós de impressão digital geralmente são reservados para uso na cena do crime em superfícies fixas ou em objetos que não possam ser facilmente transportados para o laboratório. Trata-se de processo físico em que as partículas aderem às substâncias húmidas, pegajosas ou oleosas da impressão latente. A aplicação do pó é relativamente simples e barata, e pouca experiência é necessária para obter resultados satisfatórios. As impressões desenvolvidas por pulverização também podem ser convenientemente levantadas usando fita adesiva ou *gel lifters*. Apesar destas vantagens, o pó é um método de detecção pouco sensível e normalmente apenas impressões digitais relativamente recentes serão reveladas. Tal acontece porque, com o tempo, a impressão latente seca e perde a viscosidade. As dificuldades também surgem com certas superfícies cujo fundo também fica bem visível com a aplicação de pó, sendo pouco perceptível e diferenciável a impressão digital em causa.

Óxidos metálicos, sulfetos e carbonatos têm sido comumente usados como corantes, oferecendo uma ampla gama de cores possíveis para diferentes aplicações. Por exemplo, o pó negro, composto de carvão, é aplicado em superfícies brancas ou de cores claras. Além das numerosas formulações em pó disponíveis, os pincéis para aplicação de pó na impressão digital são de variados tipos, geralmente diferenciados pelas fibras usadas no seu fabrico (por exemplo, fibras sintéticas, fibras naturais, fibra de vidro, entre outras).

A técnica do uso de pó revelador para a detecção de impressões latentes foi revista por Sodhi e Kaur [43]. O pó para revelação de impressões digitais mais utilizado é o pó de alumínio. Os flocos de alumínio, usados como pigmentos de tinta metálica, são fabricados passando a granulação de alumínio por um moinho de bolas, onde se adiciona ácido esteárico como agente de moagem. O produto final é composto de partículas planas de alumínio (de 5 a 10 μm de comprimento e cerca de 0,5 μm de espessura) contendo de 3 a 5% (m/m) de ácido esteárico. O grupo de pesquisa conseguiu produzir um pó revelador ainda mais eficiente, aumentando o teor de ácido esteárico para cerca de 10% (m/m). Verificou-se que esse pó de alumínio modificado revelava menos do fundo, oferecendo um melhor contraste nas impressões digitais reveladas. O uso de pós fluorescentes (que normalmente são luminescentes sob iluminação UV) tem

vantagens em superfícies refletivas ou multicoloridas, onde o contraste pode ser um problema com os pós de revelação convencionais. No mercado está disponível uma ampla gama de pós fluorescentes cuja escolha se resume à experiência do utilizador [9].

b) Reagente de partículas pequenas

As impressões latentes podem tornar-se visíveis por imersão do substrato numa suspensão aquosa de um pó insolúvel, seguido de lavagem com água. A suspensão de pó é comumente referida como reagente de partículas pequenas, e a técnica é essencialmente um método de pulverização húmida. A suspensão em pó é sensível aos componentes sebáceos da impressão latente (insolúveis em água) e pode ser usada numa ampla gama de superfícies não absorventes. Este método é eficaz em superfícies húmidas, uma condição que exclui o uso de pós ou reagentes convencionais sensíveis aos componentes écrinos da impressão latente (solúveis em água). O tratamento com a suspensão realiza-se por imersão ou vaporização da amostra (usando um spray de jardim portátil, por exemplo). A amostra é depois enxaguada com água para remover qualquer excesso de reagente.

Springer e Bergman, em 1995, [44] relataram o desenvolvimento de um reagente de partículas pequenas fluorescente. Isto foi conseguido pela adição de uma solução de etanol de amarelo básico 40 (BY40) à solução de reagente de partículas pequenas já existentes. As impressões desenvolvidas com o BY40 SPR (*Basic Yellow 40 Small Particle Reagent*) podem ser visualizadas no modo de luminescência com excitação a 450 nm e usando um filtro de barramento de 550 nm.

c) Fumigação por Cianocrilato

A fumigação por cianoacrilato é um método químico para a deteção de impressões latentes em superfícies não porosas, como plástico, vidro, elásticos, madeira acabada e inacabada, entre outros.

O método baseia-se na deposição de éster de cianoacrilato polimerizado em resíduos de impressões latentes. O cianoacrilato é um tipo de resina de acrilato. Os ésteres de cianoacrilato, como éster etílico, são líquidos monoméricos incolores.

O 2-cianoacrilato de alquilo é um éster de acrilato que possui o grupo carbono-azoto (ciano ou nitrilo) de ligação tripla, ligado dentro de um éster. Forma vapores que interagem com certos componentes écrinos dos resíduos de marcas de dedos latentes e são polimerizados conferindo uma cor branca. Esse polímero duro e branco é conhecido como policianacrilato [28]. A química do processo de polimerização de cianoacrilato é bem conhecida (Figura 1.11) [45]. É essencialmente uma polimerização aniônica iniciada por uma variedade de compostos básicos. Os monómeros de cianoacrilato possuem grupos eletronegativos que funcionam através de fortes efeitos indutivos. Os fortes efeitos eletroméricos dos grupos nitrilo (-CN) e alcóxicarbonilo (-COOR) são responsáveis pela sensibilidade dos alquil-2-cianoacrilatos a bases fracas. Os cianoacrilatos monoméricos puros sofrem autopolimerização em estados de vapor. Os monómeros também sofrem polimerização induzida por radicais livres. A inibição bem-sucedida da polimerização de alquil-2-cianoacrilatos depende da capacidade do inibidor para retardar a reação de polimerização. Uma variedade de compostos iniciadores inclui ácido láctico, amônia, ácido acético, aminas, álcoois, aminoácidos, alcanos e proteínas [46]–[48]. As exposições de impressões aos dois agentes mostraram aumento na quantidade de polimerização que ocorreu durante a fumigação, bem como aumento na qualidade aparente da impressão.

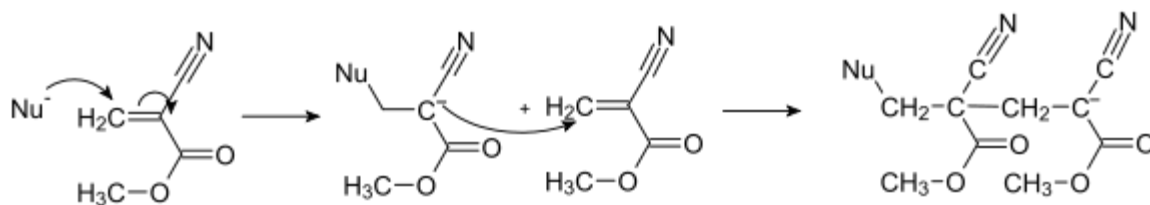


Figura 1.11 Reação de polimerização do cianoacrilato.

d) Deposição de Metal sob Vácuo

A deposição de metal sob vácuo é uma técnica extremamente sensível e útil para a detecção de impressões latentes numa variedade de superfícies, como se mostra a título exemplificativo, nas Figuras 1.12 e 1.13, e pode ser empregue em conjunto com outras técnicas de revelação (como a fumigação de cianoacrilato).



Figura 1.12 Impressão digital aposta numa cápsula de munição deflagrada, revelada com o método de deposição de metal sob vácuo [49].



Figura 1.13 Impressão digital aposta numa faca após esta ter sido recuperada de um incêndio, revelada com o método de deposição de metal sob vácuo [49].

1.3.2.3 Técnicas de Detecção para Superfícies semi-porosas

As superfícies semi-porosas, não sendo, tal como o nome indica, totalmente porosas ou totalmente não porosas, reúnem características que permitem frequentemente a utilização de algumas das técnicas de revelação de impressões digitais usadas nas superfícies não porosas, como é caso do recurso a pós de impressão digital e à fumigação por cianoacrilato, já descritos anteriormente. Pode também ser utilizado o método de deposição de metal sob vácuo, como se mostra, a título exemplificativo, na Figura 1.14, para a revelação de impressões digitais numa superfície de madeira.



Figura 1.14 Impressões digitais apostas numa superfície de madeira, reveladas com o método de deposição de metal sob vácuo com recurso a prata/zinco [49].

1.3.3 Classificação de impressões digitais

Os sistemas de classificação mais difundidos foram implementados por Galton (1892), Henry (1900) e Vucetich (1904).

Francis Galton antropólogo britânico, começou seu trabalho com impressões digitais em 1880, tendo por base os trabalhos de Herschel e Faulds. Galton verificou que existiam três perguntas fundamentais que precisavam ser respondidas de forma conclusiva antes que o método da impressão digital pudesse ser colocado em prática generalizada:

- ✓ As impressões digitais são realmente imutáveis e exclusivas para uma pessoa?
- ✓ Os padrões de impressão digital oferecem características específicas suficientes para permitir a diferenciação de centenas de milhares de pessoas?
- ✓ As impressões digitais podem ser arquivadas de modo a estabelecer, dentro de um prazo razoável, se alguém já foi previamente resenhado?

Após uma pesquisa abrangente, Galton conseguiu responder afirmativamente às três perguntas. Em 1892, publicou o seu livro "Impressões Digitais", estabelecendo a sua individualidade e permanência. O livro incluiu o primeiro sistema de classificação de impressões digitais, onde se identificaram três padrões básicos de impressões digitais - laçada, arqueada e verticilo (ou espiral, em inglês *Whorl*) – os quais eram classificados alfabeticamente e distribuídos pelos dez dedos das mãos, por exemplo: LLAWL LWWLL.

No ano de 1900 Edward Richard Henry publicou o livro "*Classification and uses of finger prints*" onde explica o seu sistema de identificação, adotando quatro categorias para a classificação de impressões digitais: arqueada, laçada, verticilo e composta, como se pode ver na Figura 1.15. Em 1901 foi adotado oficialmente em Inglaterra pela Scotland Yard e, em poucos anos, o sistema estava implementado na maioria dos países de língua inglesa.

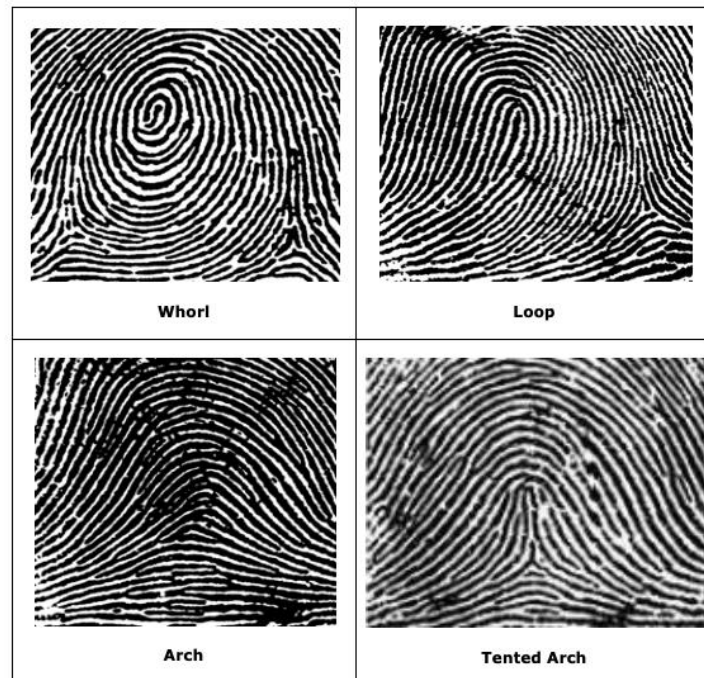


Figura 1.15 Classificação de impressões digitais segundo o sistema de Henry.

Juan Vucetich emigrou da Croácia para a Argentina quando tinha 24 anos. Encontrou emprego no Escritório de Identificação e Estatística de La Plata. Em pouco tempo Vucetich montou um escritório antropométrico totalmente operacional. Depois de estudar o artigo sobre as descobertas de Galton, Vucetich ficou convencido de que a impressão digital era um método de identificação mais vantajoso do que o método antropométrico de Bertillon. No mesmo ano, Vucetich começou a recolher impressões digitais de criminosos e desenvolveu o seu próprio sistema de classificação. Esse sistema utilizava a identificação da impressão de todos os dedos de ambas as mãos. A impressão digital apresenta três sistemas de linhas: sistema basal, que é o conjunto de linhas paralelas ao sulco que separa a segunda e a terceira falanges; sistema marginal, que é o conjunto de linhas das bordas da impressão; e o sistema central, que é o conjunto de linhas entre o sistema marginal e o basal.

Desta, as impressões são classificadas em quatro padrões: não ter arco ou delta (A ou 1), ter um delta à direita do observador (I ou 2), ter um delta à esquerda do observador (E ou 3) ou ter um delta de cada lado (V ou 4). Para fácil identificação, estas formas designam-se através de letras para o polegar e números para o resto dos dedos. O sistema de Vucetich é uma fórmula empregue para o arquivo destes dados. Nesta fórmula os dedos da mão direita são uma série e os dedos da mão esquerda são uma secção. O polegar é o fundamental e os demais dedos a divisão. Em casos de dedos amputados ou dedos defeituosos recebem marcações próprias (0 e X, respetivamente). Ex.: Série (mão direita) V (polegar) – 3223 (resto dos dedos) e Secção (mão esquerda) I (polegar) – 1312 (resto dos dedos).

Atualmente, os peritos de impressões digitais distinguem três níveis de identificação, trabalhando desde as características mais gerais de uma impressão até às mais específicas.

Os detalhes do nível 1 englobam as formas gerais dos padrões, portanto, discerníveis a olho nu. No nível 2 é necessária uma lupa para examinar os detalhes, características ou minúcias básicas da crista. Os detalhes do nível 3 tornam-se claramente visíveis somente quando examinados ao microscópio. O microscópio revela o número e a localização dos poros, bem como a forma da crista.

Os sistemas de computador de última geração projetados para análise de impressões digitais permitem um exame dos três níveis extremamente detalhado através de imagens de alta resolução, tornando redundantes as lupas e microscópios.

O processo de identificação consiste na análise da impressão deixada por um dedo ou polegar. Os peritos forenses seguem um método sequencial padronizado internacionalmente - o processo ACE-V (Análise, Comparação, Avaliação e Verificação):

- Análise: todas as características do nível 1 ao nível 3 são examinadas quanto a diferenças e semelhanças qualitativas e quantitativas;
- Comparação: as semelhanças e diferenças encontradas na impressão examinada são comparadas com uma impressão de referência;
- Avaliação: o objetivo da comparação é tirar uma das seguintes conclusões:
 - ✓ as impressões são idênticas e, portanto, foram feitas pela mesma pessoa;
 - ✓ as impressões não são idênticas e, portanto, não foram feitas pela mesma pessoa;
 - ✓ não se pode excluir que a pessoa XY tenha deixado as evidências da cena do crime em questão.

1 O Processo de Identificação

- Verificação: é o processo final onde todas as identificações devem ser verificadas por um segundo perito num exame independente das impressões digitais. As conclusões do primeiro perito só se tornam oficiais, se (e quando) o segundo perito as confirmar.

Capítulo 2

A Origem das Impressões Digitais

2.1 Morfogénese

2.2 Estrutura da pele

2.2.1 Epiderme

2.2.2 Derme

2.2.3 Hipoderme

2.3 Glândulas secretoras

2.3.1 Glândulas écrinas

2.3.2 Glândulas apócrinas

2.3.3 Glândulas sebáceas

2 A ORIGEM DAS IMPRESSÕES DIGITAIS

A pele é o maior órgão do corpo humano. Com uma área média de 1,6 m² para as mulheres e 1,9 m² para os homens, a pele é um órgão complexo constituída por diferentes camadas e estruturas. Numa observação primária da superfície das mãos e dos pés, a pele apresenta cumes e sulcos os quais cumprem três funções específicas: a) regulação térmica, b) componente táctil e c) capacidade sensorial. A existência destas formações dermopapilares na morfologia externa da pele relaciona-se com a fisiologia deste órgão [1] – ver Figura 2.1.



Figura 2.1 Pele da palma da mão de um dos dadores de vestígios dermopapilares, ampliada 2x e obtida com iluminação natural.

Vela-Romera e seus colaboradores [50] confirmaram que a pele palmo-plantar enrugada tem uma epiderme significativamente mais espessa do que a pele não endurecida. Estes resultados são concordantes com estudos anteriores que afirmam que a profundidade da pele humana das mãos e pés é de 400-600 µm, enquanto a pele de outras regiões (não sulcada), varia numa faixa de espessuras entre os 75-150 µm.

À medida que a pele progride ao longo de todo o processo de formação das cristas, muitos fatores contribuem para o resultado final: a singularidade estrutural completa, do caminho da crista à forma da crista. A morfogénese desses detalhes mais sutis é um produto único do

desenvolvimento que ocorre naquela área da pele durante o período crítico de formação da crista de atrito.

A persistência da pele do rebordo de fricção é explicada pelas ligações físicas da pele e pela substituição regulada de células perdidas na superfície da pele. A natureza persistente da pele de fricção torna-se uma característica antropológica ideal para usar como meio de identificação de indivíduos. A estrutura da pele também fornece um mecanismo através do qual descreve a distorção. A variação na aparência das impressões por atrito é devido à flexibilidade da pele.

O vestígio resultante do contacto da pele com uma superfície é uma mistura complexa de secreções naturais e contaminações. Em 1938, o Diretor do Instituto de Criminologia do Porto, Luiz de Pina, referenciou na obra *Datilosopia (Identificação – Polícia Científica)*, embora com um objetivo direcionado para a revelação dos vestígios com o objetivo da sua identificação, a importância da secreção da pele [2]:

“A função desempenhada pelo suor, que serve de tinta incolor de impressão, é importantíssima, indispensável, incomparável. É ele o denunciador fisiológico, natural e indestrutível, do malfeitor que o traz, assim, depositado e que o há-de acusar, muda e insofismavelmente, àqueles que velam pela Lei!”

2.1 MORFOGÉNESE

Nos humanos o período crucial do desenvolvimento das impressões digitais inicia na 10^a semana de gestação. Durante as primeiras semanas de vida, o feto é coberto por uma camada de células cubóides não-queratinizantes chamada periderme. Nesta fase de desenvolvimento, a epiderme (a camada externa da pele) é constituída por 3 sub-camadas: a periderme (mais externa) do lado de fora, a camada intermédia, e a camada basal (mais interna e na interface com a derme). A epiderme localiza-se em cima da derme (camada interna da pele), a qual é constituída por tecido fibroso de fibroblastos e fibras. Observa-se então que a camada basal da epiderme se torna ondulada em direção à epiderme, formando os chamados cordões primários. Os sulcos da ponta dos dedos aparecem primeiro ao longo do sulco da unha, das dobras de flexão, e em um ou dois pontos focais no meio da ponta do dedo. Daí os sulcos começam a disseminar-se pela restante pele volar (pele da palma das mãos e plantas dos pés) preenchendo-a – ver Figura 2.2. O desenvolvimento das cristas primárias cessa por volta da 17^a semana de gestação. Neste ponto, a geometria do sistema de cristas epidérmicas é determinada para a vida

e torna-se visível na superfície da pele nas semanas subsequentes. As “almofadas” volares fetais (extremidades táteis dos dedos do feto) desempenham um papel importante na formação dos padrões (simetria da “almofada” volar) e no número de cristas (tamanho da “almofada” volar), sendo que as “almofadas” volares não são responsáveis diretas no alinhamento da crista, afetando a topologia da superfície, e a tensão e compressão gerais através da junção epidérmico-dérmica. Esta junção, ainda em desenvolvimento, afeta diretamente o alinhamento da crista durante o seu desenvolvimento. Qualquer esforço ou tensão no dedo em desenvolvimento durante o estágio crítico da formação da crista de fricção pode afetar o alinhamento da crista [1].



Figura 2.2 “Almofadas” volares digitais e palmares de um feto obtidas por microscopia eletrônica de varrimento [1].

Às 24 semanas, o desenvolvimento da derme é finalizado. A epiderme é gradualmente formada pelo desenvolvimento celular da derme em cinco camadas ou estratos. Do exterior para o interior temos o estrato córneo, o estrato lúcido, o estrato granuloso, o estrato espinhoso e o estrato basal (o qual contacta com a derme). O padrão do rebordo de fricção das cristas epidérmicas na sua fase final é uma imagem projetada da estrutura na derme, mais especificamente das papilas dérmicas. Pesquisas mostraram que as papilas dérmicas evoluem com a idade, tendendo a multiplicar-se para ancorar a estrutura da pele [9].

2.2 ESTRUTURA DA PELE

A pele é um órgão composto por três camadas anatómicas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 2.3). Estas camadas atuam como uma barreira protetora, regulam a temperatura, desempenham importante papel sensitivo, na excreção e na imunidade. São também importantes como reservatório de sangue, bem como no processo de síntese de vitamina D [51].

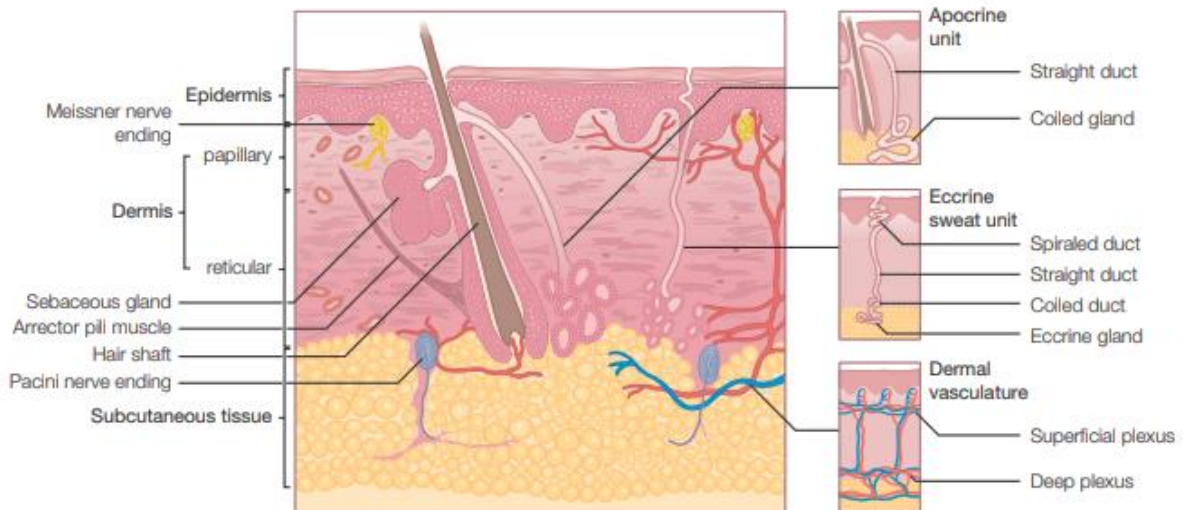


Figura 2.3 Esquema representativo das várias camadas da pele e glândulas anexas [52].

2.2.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele, sendo por isso foco central no que concerne às impressões digitais. Tem como principal função ser barreira protetora dos tecidos interiores e órgão recetor, sendo também importante na regulação da perda de água através da evaporação. Esta camada é constituída por quatro tipos de células: queratinócitos (células epiteliais, que representam 90-95% das células da epiderme), melanócitos (células produtoras de melanina responsáveis pela pigmentação da pele), células de Langerhans (constituintes do sistema imunitário) e células de Merkel (macro-recetores com função sensorial). A epiderme é um tecido que continuamente repõe as células (mortas) que deixam a superfície. As novas células são geradas na camada mais profunda e são movidas para a superfície através de uma sequência de alterações na sua composição química. Como a epiderme é uma barreira de proteção, é

essencial que na pele haja um equilíbrio entre o número de queratinócitos gerados e os que deixam a superfície da pele.

A epiderme é constituída por 5 sub-camadas de queratinócitos em diferentes estágios evolutivos (Figura 2.4). O estrato mais profundo (em contacto com a derme) – estrato basal ou germinativo – apresenta uma atividade mitótica intensa, o que contribui para a formação constante de queratinócitos os quais são empurrados em direção ao estrato córneo (mais superficial) aumentando a produção de queratina. Desde o estrato basal, os queratinócitos levam cerca de 26 dias até chegarem à camada córnea (passando pelos vários estratos). O estrato basal produz assim as células que mantêm as cristas e os sulcos apresentados na superfície [53].

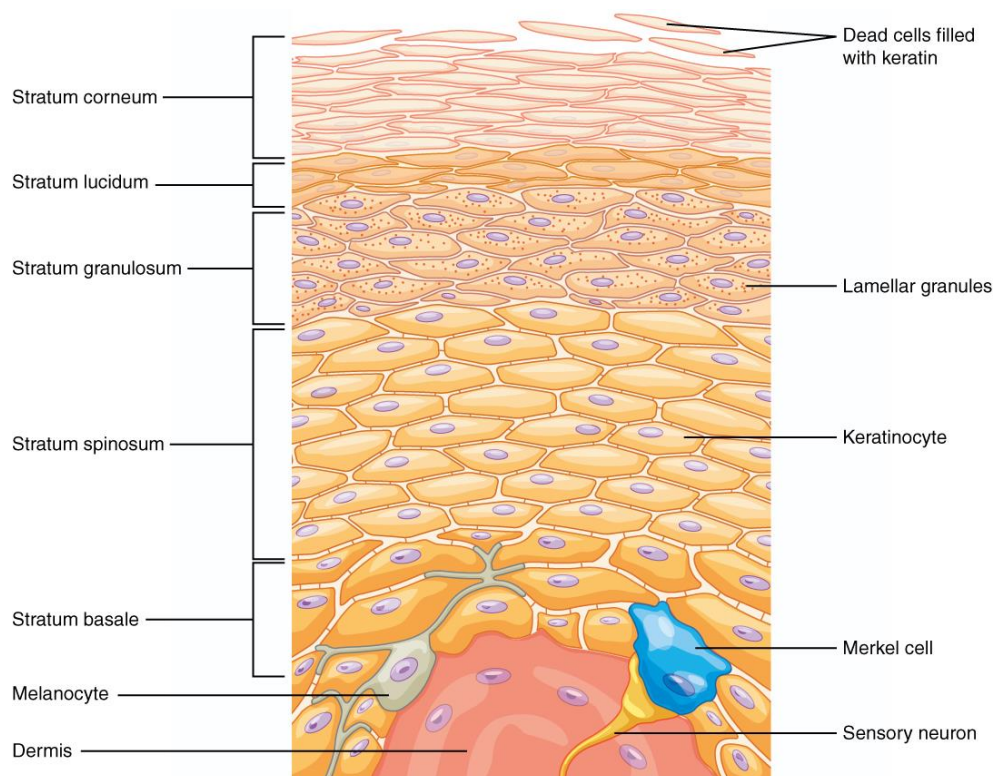


Figura 2.4 Camadas da epiderme [54].

Embora os queratinócitos mudem na composição química quando atingem a superfície, todos os queratinócitos são distinguíveis pela presença de filamentos intermediários de queratina. A queratina é uma proteína durável organizada em feixes (filamentos) que se estendem por toda a célula e fornecem suporte estrutural. Queratina reforça as células da pele para que elas não quebrem quando submetidas a stress físico. Existem cerca de 20 variedades de queratina distribuídas ao longo da epiderme, designadas K1 a K20. Os queratinócitos da pele do rebordo

de fricção expressam queratinas não expressas em outras partes do corpo, especificamente K9, K6 e K16 [55].

Os queratinócitos da pele plantar e palmar expressam um padrão mais complexo de distribuição de queratina do que o resto da pele. As diferenças na queratina produzida e distribuída nesta pele específica são atribuídas a um maior stress mecânico.

A epiderme apresenta cristas superficiais visíveis que, de um ponto de vista mecânico, suportam a maior parte da compressão quando a pele palmar ou plantar toca uma superfície, necessitando assim de maior durabilidade. A queratina mais maleável produzida nas cristas secundárias permite que os sulcos atuem como uma dobradiça entre as cristas mais rígidas da superfície. As células das cristas primárias (K9) são mais duráveis do que a queratina produzida nas cristas secundárias (K16).

A comunicação dos queratinócitos com os melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel é necessária para que a pele funcione adequadamente.

Os melanócitos produzem a melanina, o pigmento que dá cor à pele. Este pigmento é depositado nos queratinócitos protegendo o seu material genético dos danos ultravioleta. Os melanócitos residem na camada basal da epiderme que, além de fornecer os queratinócitos adjacentes à melanina, produz vitamina D [56] através da conversão do 7-dihidrocolesterol em pré-vitamina D3 pela ação dos raios UVB (290-315 nm), e posteriormente em vitamina D.

As células de Langerhans são uma extensão do sistema imunológico do corpo. Após a exposição a bactérias invasoras, as células de Langerhans iniciam um alerta que faz com que o corpo recrute células imunitárias mais agressivas e eficazes (células T) para atacar os invasores [57].

As células de Merkel são uma extensão do sistema nervoso e participam da transmissão da sensação do tato: “forma, tamanho e textura dos objetos e discriminação de dois pontos”. As células de Merkel ocorrem esporadicamente na camada basal da epiderme e estão associadas a terminações nervosas livres da derme.

Como referido, os queratinócitos são organizados em camadas ou estratos (basal, espinhoso, granular, lúcido e córneo) que correspondem a estágios progressivos de diferenciação. O processo de diferenciação na epiderme, conhecido como queratinização ou cornificação, é uma série de eventos morfológicos e metabólicos geneticamente programados e rigidamente controlados.

A queratinização envolve: a) perda da capacidade de proliferar, b) aumento do tamanho das células e achatamento das células, c) a formação de novos organelos, juntamente com a reorganização estrutural dos organelos existentes e a eventual perda de organelos, d) síntese de

novas proteínas e lípidos, e) alterações nas propriedades da membrana plasmática, antígenos da superfície celular e recetores, e f) desidratação.

A pele palmar e plantar persiste devido às ligações físicas em toda a pele e à regulação da produção e diferenciação dos queratinócitos. A morfologia tridimensional da crista superficial é mantida pela combinação do aumento da produção celular na camada suprabasal das cristas primárias (cristas sobre a superfície) e a ancoragem das células basais nas cristas secundárias (sob a superfície). A camada basal dos queratinócitos fornece o modelo para as cristas e sulcos da superfície. A comunicação celular garante que a proliferação celular basal seja estimulada e inibida de maneira coordenada. À medida que os queratinócitos basais se dividem, os anexos célula-célula garantem que as células se movam em direção à superfície em conjunto.

Na pele, as membranas plasmáticas das células adjacentes são separadas por um espaço intercelular. Estudos histoquímicos por microscopia eletrónica mostraram que esse interespaço contém glicoproteínas e lípidos. Grânulos lamelares (corpos de Odland, queratinossomas ou grânulos de revestimento de membrana) aparecem neste espaço, principalmente na interface entre as camadas celulares granuladas e cornificadas. Os grânulos lamelares contribuem para a coesão e impermeabilidade da pele. Glicolípidos como ceramidas contribuem com uma função de barreira para a pele e são tipicamente encontrados em produtos tópicos destinados a restaurar a barreira epidérmica. Os corpos lamelares formam-se anormalmente na ausência de ceramidas críticas, como a glicosilceramida, ou se há desproporção de lípidos críticos [52]. Situações patológicas como a ictiose lamelar e a hiperqueratose de Flegel demonstram grânulos lamelares anormais.

Enzimas hidrolíticas dos grânulos lamelares são libertadas com os lípidos e estão envolvidas na sua reorganização e posterior “montagem” nas lamelas intercelulares. A alteração na morfologia corresponde à remodelação de lípidos (glicolípidos, esteróis livres e fosfolípidos) para “barreira” dos lípidos (por exemplo, esfingolípidos que criam uma barreira hidrófoba na interface entre as camadas granular e cornificada). A epiderme tratada com solventes orgânicos perde as suas propriedades de barreira. Esta barreira reduz a perda de água da pele e impede o movimento de compostos polares [57].

2.2.2 Derme

A derme é a camada intermédia da pele – ver Figura 2.5. Trata-se de um tecido conjuntivo fibroso moderadamente denso composto de colágeno (ou colagénio), fibras de elastina (uma

proteína fibrosa contendo principalmente glicina, alanina, valina e prolina) e um gel interfibrilico de glicosaminoproteoglicanos, sais e água.

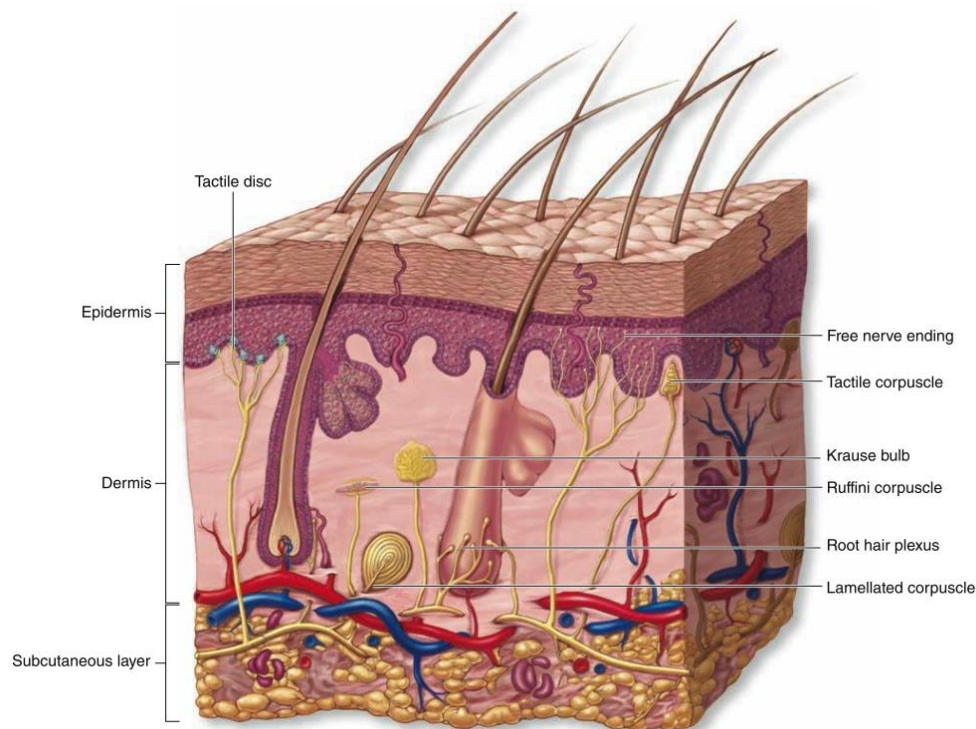


Figura 2.5 Histologia da derme [56].

O principal componente da derme é o colágeno, uma família de proteínas fibrosas que compreende pelo menos 15 tipos geneticamente distintos na pele humana. O colagénio é rico em aminoácidos, principalmente glicina, mas também lisina, prolina, hidroxiprolina, hidroxilisina. Moléculas de colagénio dos tipos I, II, III, V e XI agregam-se formando as fibrilas de colagénio, onde o colagénio tipo I aparece em destaque, sendo por isso o principal componente da derme. A estrutura do colágeno tipo I é de largura uniforme, e cada fibra exhibe traçados característicos com uma periodicidade de 68 nm.

As fibras de colágeno formam uma malha irregular que é aproximadamente paralela à superfície epidérmica e que fornece resistência à tração e resistência ao stress mecânico. A elastina confere à pele a sua elasticidade e a capacidade de retomar à sua forma natural após deformação. Esteiras fibrosas de elastina são misturadas com colágeno para dar à pele a sua tensão. Esta tensão é maior em áreas do corpo onde a pele é fina e a elastina é abundante (por exemplo, o couro cabeludo e a face). Fibroblastos, que formam elastina e colágeno, e histiócitos, que formam o interferão para proteção contra infecções virais, também estão presentes na derme. Um sistema de vasos sanguíneos, linfáticos e nervosos também está presente.

A derme é dividida em duas regiões anatómicas: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar é a porção mais externa da camada dérmica e contém fibrilas de elastina e colágeno menores e mais vagamente distribuídas do que a derme reticular. As papilas são supridas por numerosos capilares, que fornecem nutrição para a epiderme via difusão. A segunda região, a derme reticular, fica abaixo da derme papilar e compreende a maior parte desta camada. É caracterizada por tecido conjuntivo denso em colágeno e elastina. Esses feixes de colágeno são dispostos predominantemente em fios entrelaçados que são paralelos à superfície da pele, embora alguns feixes tangencialmente orientados estejam presentes. O hialuronano (ácido hialurônico) é um componente secundário da derme normal, mas é o principal mucopolissacarídeo que se acumula nos estados patológicos. A derme contém até cinco milhões de glândulas secretoras, incluindo as glândulas écrinas, apócrinas e sebáceas.

2.2.3 Hipoderme

Abaixo da derme reticular fibrosa, há uma transição abrupta para o tecido adiposo da hipoderme. Esta camada é constituída por tecido conjuntivo e principalmente por tecido adiposo (gordura) o qual serve como uma reserva de energia, protege a pele, contorna o corpo e permite a mobilidade da pele sobre as estruturas subjacentes, representando entre 10 e 30% do peso corporal. A derme e a hipoderme contactam fisicamente através de fibras interligadas e compartilham vasos sanguíneos e redes nervosas. A célula primária da hipoderme é o adipócito. Os adipócitos são organizados em lóbulos por tecido conjuntivo fibroso e armazenam a gordura subcutânea [57].

A hipoderme é composta por duas camadas: a camada areolar – mais superficial – e a camada lamelar – mais profunda. A camada areolar, composta por adipócitos globulares, volumosos e dispostos verticalmente, é separada da camada lamelar por uma fáscia fibrosa – a fáscia subcutânea. Abaixo desta fáscia encontra-se a camada lamelar responsável pelo aumento de peso e espessura, pelo proporcional aumento de volume dos adipócitos.

2.3 GLÂNDULAS SECRETORAS

A pele cumpre integralmente a sua função através de um conjunto de estruturas anexas. Para além da importância das unhas e dos pelos, passando pelas estruturas nervosas, são de destacar as glândulas secretoras, as quais segregam suor e sebo, ajudando na termorregulação e lubrificação, bem como na proteção da pele. O suor é produzido pelas glândulas sudoríparas (as quais podem ser écrinas ou apócrinas), enquanto que o sebo é produzido nas glândulas sebáceas. O sebo é uma mistura complexa de lípidos que inclui cera, ésteres, esqualeno, colesterol e triglicerídeos que são hidrolisados por enzimas bacterianas após a secreção.

A secreção das glândulas sebáceas aumenta muito na puberdade, estimulada principalmente pela testosterona nos homens e pelos ovários e adrenais andrógenos nas mulheres. O sebo ajuda a manter o estrato córneo e os fios de cabelos e exerce fracas propriedades antibacterianas e antifúngicas [58].

2.3.1 Glândulas Écrinas

Na região papilar da derme, as glândulas sudoríparas écrinas são uma estrutura com um papel de destaque. Estas são glândulas sudoríparas de pequena dimensão, cujo canal excretor se abre num poro diretamente na superfície da pele. Estão presentes em toda a superfície do corpo e a sua principal função é a termoregulação. São as glândulas écrinas que libertam o suor no exterior dissipando o calor. As glândulas sudoríparas das palmas das mãos e das plantas dos pés são maiores, mais ativas e mais densas do que qualquer outra zona da pele. Nos dedos existem cerca de 18 por mm^2 , nas palmas das mãos cerca de 120 por cm^2 e na planta dos pés cerca de 300 por cm^2 . A porção secretória da glândula encontra-se na derme ou na hipoderme, sendo que o seu ducto se estende até à epiderme. O fluido segregado pelas glândulas écrinas é predominantemente constituído por água (99-99,5%). Os restantes constituintes conhecidos do suor incluem cloreto de sódio, potássio, amónia, ureia, lactato, ácido úrico, creatina e creatinina, aminoácidos, açúcares, imunoglobulina A, fator de crescimento epidérmico, hormonas, enzimas e vitaminas.

2.3.2 Glândulas Apócrinas

As glândulas apócrinas são outro tipo de glândulas sudoríparas. Estas glândulas são grandes estruturas enroladas que estão localizadas próximas dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas associadas. Localizam-se principalmente nas regiões axilar e perineal. Embora possam ocasionalmente ser encontradas em localizações ectópicas, as glândulas apócrinas do corpo humano são geralmente confinadas aos seguintes locais: axilas, aréolas, região anogenital, canal auditivo externo (glândulas ceruminosas) e pálpebras (glândulas de Moll).

Na fase embrionária, as glândulas apócrinas encontram-se dispersas por todo o corpo, sob uma forma muito rudimentar. No desenvolvimento intrauterino vai-se reduzindo esta dispersão às zonas referidas, as quais ficam definidas após o nascimento. Na puberdade entram em funcionamento eliminando uma secreção dentro do canal do folículo (substância mais viscosa que o suor), o que pode evidenciar uma relação com a produção de odor corporal específico e a sua relação com a atração sexual.

A porção excretora dessas glândulas toma a forma de uma enorme bobina entrelaçada que se pode estender até a camada gordurosa sub-dérmica. O ducto que sai da bobina toma um caminho mais ou menos vertical e paralelo a um folículo piloso adjacente, abrindo-se um pouco mais acima da glândula sebácea. As porções secretoras das glândulas sudoríparas apócrinas têm lúmenes muito maiores do que as das glândulas sudoríparas écrinas. Os ductos das glândulas apócrinas também diferem das glândulas écrinas em abertura nos folículos pilosos ao invés da superfície epidérmica.

A análise detalhada das secreções apócrinas é complicada pela contaminação das glândulas écrinas e sebáceas. Um dos poucos estudos feitos sobre secreções apócrinas humanas encontrou uma substância que era leitosa na aparência. Esse material era fluorescente e tinha um odor variável. Uma fonte relatou várias substâncias isoladas de secreções apócrinas, incluindo proteínas, hidratos de carbono, colesterol [59] e ferro. Sulfatos de C19-esteróides e Δ 16-esteróides (por exemplo, 5 α -androst-16-en-3 α -ol e 5 α -androst-16-en-3-ona) também foram relatados [28],[60],[61].

2.3.3 Glândulas Sebáceas

As glândulas sebáceas localizam-se geralmente em regiões do corpo onde os pêlos estão presentes. Estas glândulas são responsáveis pela produção de sebo, constituído por uma grande variedade de compostos orgânicos, glicéridos, ácidos gordos, esqualeno e colesterol [62].

A glândula sebácea, composta por sebócitos, localiza-se na derme da pele de todos os mamíferos terrestres, principalmente associada aos folículos pilosos e aos músculos eretores do pelo que formam a unidade pilosebácea. Há também uma grande variabilidade intraindividual na distribuição das glândulas sebáceas, pois a densidade das glândulas em várias regiões do corpo é marcadamente diferente [62].

As glândulas sebáceas segregam uma mistura complexa e oleosa de lípidos, chamada sebo, através de ductos curtos que, na maioria das áreas, se abrem para os folículos pilosos. A produção de sebo é o exemplo clássico da secreção holócrina, na qual toda a célula morre e contribui para o produto secretório.

A constituição do sebo pode ser influenciada pela alimentação e pela genética. Esta secreção apresenta um aspeto esbranquiçado e contribui para a proteção e hidratação das camadas mais externas da pele. A investigação bioquímica dos lípidos da pele refere que pequenas diferenças na composição dos ácidos gordos constituintes do sebo contribuem para o odor único e individual de cada pessoa.

A maioria dos lípidos produzidos pela glândula sebácea também são produzidos noutras partes do corpo. Os sebócitos expressam recetores de histamina e os anti-histamínicos podem reduzir os níveis de esqualeno, sugerindo que os anti-histamínicos podem ter um papel na modulação da produção de sebo. Os lípidos da pele contribuem para a função de barreira, e alguns possuem propriedades antimicrobianas. Os lípidos antimicrobianos incluem bases esfingóides livres derivadas de ceramidas epidérmicas e ácidos gordos (por exemplo, ácido sapiénico) derivados de triglicéridos sebáceos [56].

Capítulo 3

Química das Impressões Dermopapilares

– *Estado da Arte*

- 3.1 Composição Química
- 3.2 Desenvolvimento / Melhoramento de Técnicas de Revelação
- 3.3 Datação das Impressões Digitais
- 3.4 Determinação do Género
- 3.5 Determinação da Idade
- 3.6 Detecção de Substâncias Exógenas

3 QUÍMICA DAS IMPRESSÕES DERMOPAPILARES – ESTADO DA ARTE

3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química dos vestígios das impressões digitais tem sido estudada desde há muito. Artigos publicados nos anos 60 do século XX já descrevem a ocorrência natural de ácidos gordos e óleos nos vestígios de suor das palmas das mãos, evidenciando a diversidade e complexidade de materiais de natureza lipídica que constituem a pele humana. Existem inúmeros trabalhos científicos publicados sobre os compostos segregados pelas glândulas écrinas e sebáceas para fins dermatológicos ou médicos [63],[64],[73]–[79],[65]–[72], porém estes estudos não são suficientes para a análise química forense das impressões digitais.

Alguns dos estudos efetuados até à data detetaram e quantificaram muitos dos compostos presentes nos vestígios dermopapilares - Tabela 3.1 [80].

Tabela 3.1 Compostos identificados em vestígios de impressões digitais com origem nas glândulas écrinas e sebáceas.

Glândulas écrinas	Glândulas sebáceas
Proteínas	Ácidos gordos
Ácido láctico	Esteróis
Iões Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+	Glicéridos
Ião Cl^-	Ésteres de colesterol
Aminoácidos	Esqualeno
Ureia	Produtos de oxidação do Esqualeno
Amoníaco (NH_3)	Colesterol
Fenol	
Sulfatos	
Glicogénio	
Ácido úrico	
Creatinina	
Vitaminas	

Por outro lado, os cientistas forenses têm estudado vestígios de impressões dermopapilares com recurso a diversas técnicas analíticas (Tabela 3.2), sendo largamente utilizadas técnicas de cromatografia, espectroscopia e espectrometria de massa. Nos últimos anos, as técnicas avançadas de espectrometria de massa têm tido especial relevância no que concerne à identificação de espécies químicas.

Tabela 3.2 Técnicas analíticas utilizadas na deteção/quantificação de compostos constituintes de vestígios de impressões digitais [81].

Técnicas	Compostos identificados
Fotometria de chama	sódio, potássio, cloreto, cálcio, magnésio, fenol, amónia, ião amónio, ácido úrico
Cromatografia em Camada Fina (TLC)	aminoácidos, vitaminas, esqualeno
Eletroforese [82]	polipéptidos, lubrificantes de preservativos
Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) com ou sem imagiologia [83]–[88]	proteínas, ácidos lácticos, ureia, aminoácidos, produtos de oxidação do esqualeno, lubrificantes de preservativos, aspirina, diazepam, cafeína, explosivos, drogas
Espectroscopia Raman [84],[89],[90]	aminoácidos, creatinina, ureia, lubrificantes de preservativos, drogas
Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS) [91]–[93]	aminoácidos, ureia, produtos de oxidação do esqualeno, lípidos
GC-MS com pirólise	aminoácidos
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) [94]	ácido úrico, explosivos
Espectrometria de massa com Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) (com ou sem imagiologia) [95]–[101]	aminoácidos, triglicéridos, ácidos gordos livres, lubrificantes de preservativos, explosivos, proteínas, fármacos
Espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS)	esqualeno e respetivos produtos de oxidação
Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização química à pressão atmosférica (LC-APCI-MS)	produtos de oxidação do esqualeno
Espectrometria de massa com Ionização/dessorção a laser assistida por superfície e com tempo de voo (SALDI-ToF-MS) [102]	nicotina, explosivos
Espectroscopia de decomposição induzida por laser (LIBS) [103]	potencialidade de diferenciação entre amostras

Todas estas técnicas têm vantagens e desvantagens, podendo ser selecionadas de acordo com o objetivo da análise, ou seja, com o tipo de informação que se pretende obter acerca do indivíduo que produziu o vestígio. Quando é conseguida a identificação do indivíduo, outro tipo de informação também é relevante, como, por exemplo, se este esteve em contacto com drogas ou explosivos. Nestes casos, quase todas as técnicas podem ser usadas e os resultados podem ser utilizados, por exemplo, para verificação da veracidade de alguns testemunhos.

Estes estudos, para além da contínua elucidação da composição química dos vestígios dermopapilares, têm como objetivos operacionais:

- ✓ desenvolvimento ou melhoramento de técnicas de revelação;
- ✓ datação das impressões digitais;
- ✓ determinação do género;
- ✓ determinação da idade;
- ✓ deteção de substâncias exógenas.

3.2 DESENVOLVIMENTO E MELHORAMENTO DE TÉCNICAS DE REVELAÇÃO

A maioria das técnicas de deteção para a visualização de impressões digitais latentes usa agentes de coloração que interagem com compostos endógenos segregados na pele, incluindo glicéridos, ácidos gordos e aminoácidos [104]–[111].

Os aminoácidos têm sido alvo de inúmeros estudos. A sua reação com um determinado composto tem o potencial de permitir a visualização da impressão digital latente, como é o caso da reação em superfícies porosas com ninidrina, 1,8-diazafluoren-9-ona (DFO) e indanediona [32],[112], tal como já explicado no Capítulo 1.

A riboflavina ou vitamina B2 foi identificada por cromatografia de camada fina assistida por laser como sendo a responsável pela fluorescência observada quando o vestígio é iluminado com um laser de árgon com um comprimento de onda de excitação de 488-514,5 nm [113].

A síntese e caracterização de cianoacrilatos modificados para produção de imagens químicas de impressões digitais por FTIR foi estudada por Mark Tahtouh [114],[115]. A região do IV normalmente contém muito poucas bandas vibracionais, sendo, portanto, desejável um reagente que possa ser usado para fornecer absorções de impressões digitais nessa faixa, permitindo obter as informações necessárias através do contraste entre os detalhes da crista digital tratada e o

fundo em que ela esteja localizada. Foram sintetizados 4 reagentes: 2-cianoetil-2-cianoacrilato (2-CECA), 1-cianoetil-2-cianoacrilato (1-CECA), 2-cianoacrilato de trideuterometil (MCA-d3) e 2-cianoacrilato de pentadeuteroetil (ECA-d5). O monómero 2-CECA mostrou-se menos volátil que o cianoacrilato convencional, tendo-se decomposto termicamente na faixa de temperaturas necessárias para o vaporizar. O tratamento de impressões digitais latentes com este monómero a pressão reduzida produziu melhores resultados em superfícies refletivas (como por exemplo, notas de polímero), no entanto, a banda de nitrilo de 2-CECA mostrou-se quase indetetável, não podendo, portanto, ser usada para gerar imagens das impressões tratadas. Impressões digitais tratadas com os monómeros deuterados (MCA-d3 e ECA-d5) mostraram bandas características na região de 1900 a 2300 cm^{-1} devido a vibrações de alongamento na ligação carbono-deutério. No entanto, a intensidade relativamente baixa destas bandas significa que foram detetadas apenas a partir de impressões em superfícies refletivas. O monómero que produziu os melhores resultados foi o 1-CECA. A banda de absorção para o grupo carbonilo no poli-1-CECA é suficientemente resolvida a partir de qualquer absorção nesta região na superfície de fundo (como por exemplo, notas de banco de polímero) para fornecer boas imagens de contraste da impressão digital tratada.

O cianoacrilato a vácuo (com coloração BY40) e o ácido selénico são métodos atuais sensíveis para a revelação de impressões em cartuchos de armas [116]. Um entendimento da degradação térmica de resíduos de impressões digitais pode levar ao desenvolvimento de novos reagentes visando resíduos de degradação térmica, pelo que Amy Richmond-Aylor e seus colaboradores [117] estudaram a pirólise de aminoácidos por GC-MS. A alanina e o ácido aspártico produziram, através de reações de condensação, os marcadores pirolíticos de aminoácidos mais promissores 3,6-dimetilpiperazina-2,5-diona, e maleimida e 2,5-furandiona, respectivamente. Não foram identificados produtos pirolíticos nos casos de serina, glicina e lisina.

Ho-Wai Tang e seus colaboradores [118], em 2010, integraram certas propriedades distintas das nanopartículas de ouro (AuNPs) com a espectrometria de massa de imagem para visualização e imagem molecular de impressões digitais latentes. Duas cores contrastantes (azul e rosa), decorrentes de diferentes bandas de ressonância plasmônica superficial (SPR) dos AuNPs, revelaram as imagens óticas das impressões. A interação / aprisionamento dos AuNPs nos cumes por uma mistura de compostos endógenos, como componentes de ácidos gordos, puderam impedir a agregação de AuNPs e, assim, favorecer a formação de AuNPs de menor tamanho e forma pseudo-esférica, enquanto as nano-ilhas de ouro formadas nos sulcos eram de forma irregular e de maior tamanho. A propriedade de dessorção / ionização a laser dos AuNPs

permite a análise direta de compostos endógenos e exógenos incorporados nas impressões latentes e a geração de imagens das suas distribuições sem perturbar os padrões de impressão digital. A distribuição espacial de substâncias gordas endógenas pode ser usada para construir as imagens moleculares das impressões digitais latentes que são idênticas à imagem ótica.

Recentemente, Hélio Barros [20] sintetizou pós fluorescentes microestruturados à base de corantes benzazólicos para visualização de impressões digitais em diferentes tipos de superfície (porosas e não porosas) e cor (escuro, branco e multicolorido). A alta fluorescência emitida por estes pós criou alto contraste com as impressões digitais, independentemente da cor de fundo da superfície, facilitando a detecção e fotografia das impressões digitais.

3.3 DATAÇÃO DAS IMPRESSÕES DIGITAIS

A partir do momento em que a impressão digital é depositada numa superfície, as eventuais alterações químicas dos diferentes compostos ocorrem, sendo as mesmas diretamente influenciadas pelas condições ambientais.

Compostos insaturados como o esqualeno e os ácidos oleico e palmitoleico desaparecem ao longo do tempo, enquanto compostos saturados tendem a permanecer inalterados. Compostos de massa molecular baixa aparecem ao longo do tempo como produtos de degradação dos compostos insaturados.

Por exemplo, pode considerar-se a degradação do esqualeno, a qual é mais rápida quando o vestígio é sujeito a condições de iluminação forte. Os produtos de degradação resultantes da oxidação do esqualeno (monohidroperóxido e epóxido de esqualeno) podem constituir potenciais alvos para o desenvolvimento de reagentes de visualização [119].

Também como aplicação do estudo dos vários componentes, diversas metodologias foram desenvolvidas com vista à determinação da idade do vestígio, visto ao longo do tempo os compostos serem sujeitos a um contínuo processo de degradação, metabolismo, secagem, evaporação, migração, oxidação e polimerização [9],[119],[120].

Céline Weyermann e seus colaboradores [121] analisaram por GC-MS as impressões digitais de seis dadores, entre os 25 e os 35 anos, para determinação do tempo após deposição numa superfície de vidro e em microfiltros. O esqualeno e o colesterol foram identificados em todas as análises efetuadas. No vidro, o esqualeno diminuiu muito rapidamente no primeiro dia, e não pôde ser detetado após mais de uma semana, enquanto nos microfiltros a diminuição ocorreu a

um ritmo muito mais lento, podendo ainda ser detectado após 30 dias. Outros compostos não mostraram mudanças significativas ao longo do período estudado, e a área do pico do esqualeno a dividir pela área do pico do colesterol resultou em curvas de envelhecimento mais reprodutíveis.

Ainda com recurso a GC-MS, Stefanie Pleik e seus colaboradores [122] propuseram em 2016 uma nova técnica de preparação de amostras que permite a produção de derivados de N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) dos ácidos gordos insaturados analisados e dos seus produtos de degradação. Para este estudo utilizaram 30 dadores de impressões digitais utilizando folha de alumínio como substrato. Verificaram que os ácidos gordos insaturados iniciais se degradaram rapidamente no decorrer do envelhecimento, sendo que, na maioria das amostras analisadas, deixaram de ser detetáveis 14 dias após a deposição.

Um estudo explorou a decomposição do ácido C₁₈ (ácido oleico) insaturado ao longo do tempo e usou os produtos de decomposição para distinguir com sucesso três impressões digitais de diferentes idades usando MALDI-MSI [123].

Como referido em vários estudos, as impressões digitais contêm proteínas e lípidos. As proteínas contendo triptofano contribuem para a autofluorescência de impressões digitais “frescas”. Quando expostas ao ar, os lípidos insaturados oxidam e formam produtos de oxidação reativa que reagem com as proteínas para formar oxidações com produtos fluorescentes.

Com base neste pressuposto, Annemieke van Dam e seus colaboradores [124] estabeleceram uma metodologia para estimar a idade dos vestígios das impressões digitais por Espectroscopia de Fluorescência.

Aline Girod e seus colaboradores [86] estudaram o envelhecimento de impressões digitais durante 34 dias por μ -FTIR nas regiões espectrais 1000-1850 cm⁻¹ e 2700-3600 cm⁻¹ com recurso a ATR. Verificaram que o material de origem nas glândulas écrinas rapidamente desaparece, enquanto o material com origem nas glândulas sebáceas diminuiu no período de estudo, sem desaparecer completamente.

A exposição ao vácuo causa uma redução significativa na composição lipídica de uma impressão digital, em particular com a perda de ácido tetradecanóico e pentadecanóico, não observados em amostras envelhecidas. Existem portanto implicações para a sequência na qual são realizados procedimentos de revelação de impressões digitais (por exemplo, deposição de metais a vácuo), bem como o uso de métodos baseados em vácuo, como espectrometria de massa de iões secundários (SIMS) e ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) no estudo da química das impressões digitais [125].

3.4 DETERMINAÇÃO DO GÉNERO

Atualmente, apenas a forma, o tamanho e o padrão de riscas associados a impressões digitais são comparados visualmente, bem como através de softwares para identificação biométrica.

Existem estudos recentes que propõem a diferenciação de género através da análise dos padrões da impressão digital [126]–[131]. Porém, foram observadas diferenças na densidade dos padrões entre homens e mulheres de diferentes etnias, pelo que esta metodologia não deverá ser aplicada em populações multiculturais [132].

A determinação colorimétrica do género foi conseguida por Erica Brunelle e seus colaboradores [133] através da reação da ninidrina com os aminoácidos constituintes dos vestígios latentes de impressões digitais. Contudo o procedimento analítico para a preparação de amostras é complexo e não operacional.

Como já referido anteriormente, a 2-amino-1,3-indanodiona é usada para visualização de impressões digitais latentes em superfícies porosas [134]. Este composto também reage com os aminoácidos presentes na impressão digital, originando nos espectros de fluorescência picos com diferentes intensidades, dependendo do género do dador. Os estudos efetuados sugerem uma concentração de aminoácidos no resíduo das impressões digitais de mulheres dupla da sua concentração nos homens [135].

De facto, em 2010, Croxton e seus colaboradores [32] determinaram por GC-MS que os níveis de aminoácidos nas mulheres são muito superiores aos dos homens.

Alguns dos biomarcadores descritos na literatura que possibilitam esta análise são a dermicidina (DCD-1L) e péptidos seus derivados (SSL-29 e LEK-45). Através da análise de massa de péptidos e pequenas proteínas por MALDI-MSI, seguida de uma análise estatística multivariada PLS-DA, foi conseguida a discriminação entre género com uma predição de 68,9% para o género feminino e 74,4% para o género masculino, numa população de estudo de 80 pessoas (40 femininos, 40 masculinos) entre os 20 e 45 anos [100]. Muitos dos estudos efetuados com recurso a técnicas avançadas de análise acopladas a técnicas de imagiologia [98],[136] são considerados por alguns autores de grande interesse académico, mas demasiado caros [81].

Num estudo mais recente (2019) analisou-se a composição química de 1852 impressões digitais de 463 dadores (179 masculinos, 280 femininos e 4 desconhecidos, com idades compreendidas entre os 18 e os 63 anos, numa média de idades de 26 anos), no festival de música holandês

Lowlands. Para uma abordagem metabólica direcionada, analisaram-se os perfis de aminoácidos de 926 impressões digitais (463 naturais e 463 écrinas) usando LC-MS, quantificando-se o conteúdo de ácidos gordos, esqualeno e colesterol nas outras 926 impressões digitais (463 naturais e 463 sebáceas) usando GC-MS. Utilizaram-se testes estatísticos para encontrar diferenças significativas na abundância de aminoácidos e lípidos. Numa abordagem não direcionada, usaram-se os dados de MS das impressões digitais analisadas para gerar árvores de inferência condicionais como modelos de classificação para prever duas características forenses relevantes dos dadores: género e hábito de fumo dos dadores das impressões digitais [137].

3.5 DIFERENCIAÇÃO DA IDADE

Há aspetos que claramente variam com a idade do dador. Um deles é o aumento da visibilidade do padrão de riscas com a idade; outras características são mais expressivas na puberdade [28]. Amostras de lípidos da superfície da pele foram recolhidos do couro cabeludo de 40 homens, com idades entre 9 e 15 anos, sendo a composição da classe lipídica de cada um, analisada quantitativamente por cromatografia de camada fina. A proporção de ésteres / [colesterol + ésteres de colesterol] aumentou com a idade [138].

Nazarro-Porro e seus colaboradores [139] verificaram, também por TLC e fotodensitometria, a composição química da superfície da pele em 194 indivíduos de diferentes idades. Observaram a existência de um nível elevado de ácidos gordos insaturados do tipo Δ^9 antes da puberdade com tendência a diminuir, atingindo um nível mínimo nas idades de 20 a 65 anos. No entanto, é importante ressaltar que estes estudos não foram efetuados em impressões digitais latentes. Em 2008, Hemmila e seus colaboradores [140] usaram a técnica FTIR para estimar a idade do dador da impressão digital. Utilizaram no estudo 78 indivíduos com idades compreendidas entre os 4 e os 68 anos. Através de PCA conseguiram agrupar a população do estudo em quatro grupos: 4-5, 11-14, 18-26 e 29-70 anos.

Dois anos depois, Kimone Antoine e seus colaboradores [141] também conseguiram, por μ -FTIR e utilizando análise hierárquica de *clusters*, distinguir impressões digitais de crianças e adultos com base na sua composição lipídica.

Atualmente ainda não existe nenhuma metodologia consensual para a determinação da idade do indivíduo, mas os resultados anteriores revelam uma área promissora a explorar.

3.6 DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS EXÓGENAS

Como já referido, a etapa de deposição de uma impressão digital é afetada pelas características dos dadores [92]:

- ✓ idade, sexo, raça e dieta;
- ✓ condições de deposição, incluindo ação de deposição, tempo de contato, ângulo e pressão;
- ✓ natureza do substrato, incluindo porosidade, curvatura e textura da superfície.

Alguns autores registraram uma grande intravariabilidade na composição química das impressões digitais [142]. Essas diferenças observadas foram atribuídas a causas como dieta, doença e fisiologia dos diferentes dadores.

Além de compostos provenientes da epiderme e glândulas secretoras, os resíduos de impressões digitais também contêm muitos contaminantes, como resíduos de alimentos, poeira e/ou esporos de bactérias [28]. Cosméticos, como produtos para o cabelo, resíduo de perfume, rosto ou cremes para o corpo também foram frequentemente identificados em resíduos de impressões digitais usando GC-MS [121],[143],[144]. Koenig e seus colaboradores [144] constataram que quando o dador que utilizava um creme, o aplicava regularmente, verificava-se uma diminuição significativa na quantidade e variedade de compostos: os ácidos gordos estavam totalmente ausentes, enquanto os ésteres de esqualeno, colesterol e cera eram detetados em menor quantidade do que quando o creme não era aplicado regularmente.

Foi usado ATR-FTIR com sistema de imagiologia para a análise de vestígios de impressões digitais através de uma *lift tape* [145]. O método foi aplicado a impressões digitais contaminadas com vários tipos de resíduos cosméticos e medicamentos em superfícies porosas e não porosas.

Wolstenholme e seus colaboradores [123] identificaram o ião dimetildioctadecil amônio, constituinte de loções para o corpo e cabelo, por MALDI-MSI. Importante realçar que os cosméticos podem dificultar a diferenciação do resíduo de impressão digital intrínseco pois podem conter compostos lipídicos que também estão naturalmente presentes nas secreções da impressão digital, por exemplo, ácidos gordos (como o ácido palmítico) ou ésteres de cera (como o miristato de miristilo).

A contaminação por nicotina também foi identificada em resíduos de marcas de dedos através de espectrometria de massa com ionização/dessorção a laser assistida por superfície e com

tempo de voo (SALDI-ToF-MS) [146]. O objetivo deste estudo foi verificar se a presença de nicotina no resíduo de marca de dedo poderia ser usada para avaliar os hábitos de fumo do dador. Observou-se que a contaminação cruzada ativa de um fumador para um não fumador poderia ocorrer através de apertos de mão, e que a contaminação cruzada passiva também era possível através do contato com superfícies. No entanto, ao comparar as intensidades de pico, essas contaminações cruzadas ocorreram em níveis inferiores aos da contaminação direta devido ao contato com a nicotina durante o fumo.

Um estudo mais recente [137], por LC-MS, permitiu a diferenciação entre fumadores e não fumadores numa população de 926 indivíduos. Os níveis putativos de hidroxipiridina, nicotina e cotinina foram, respetivamente, 2,76, 11,74 e 5,70 vezes mais altos, em média, nas impressões digitais dos fumadores em comparação com as dos não fumadores. Estes autores também determinaram que os níveis de L-alanina diferem para os dadores que indicaram ter usado cannabis, enquanto os níveis de L-prolina diferiram para os dadores que consumiram uma grande quantidade (> 15 unidades) de álcool.

Diferentes técnicas de imagem química foram propostas para o desenvolvimento de novas técnicas de aprimoramento para impressões latentes, com base na deteção de materiais exógenos (drogas ilícitas, explosivos, resíduos de disparo, aspirina, diazepam e cafeína).

A aplicação da espectroscopia Raman para a análise de material exógeno em impressões digitais latentes é relatada para impressões digitais contaminadas que foram tratadas com pós e, posteriormente, levantadas com fitas adesivas [147]. Uma seleção de analgésicos de venda livre foi analisada, tendo-se depositado impressões digitais contaminadas em lâminas de vidro limpas. A aplicação de pós à base de alumínio ou ferro a impressões digitais contaminadas não interferiu no espectro Raman obtido para os contaminantes. Na maioria dos casos, a fluorescência de fundo atribuída ao conteúdo sebáceo da impressão digital latente foi reduzida pela aplicação do pó, reduzindo assim a interferência espectral. A espectroscopia Raman também foi utilizada para a análise de drogas [148] em impressões digitais latentes que foram tratadas com pós e, posteriormente, levantadas com fitas adesivas. Nas amostras foram introduzidos ecstasy, cocaína, cetamina e anfetamina. Através de FTIR por micro-refletância de imagens de impressões digitais foram identificadas substâncias exógenas como cafeína, diazepam, aspirina, paracetamol, cocaína, PETN e nitrato de amónia [149].

Também foram identificadas sulfonamidas e L-dimetil-anfetamina no suor écrino com concentrações proporcionais aos níveis plasmáticos. Estes medicamentos parecem penetrar nas glândulas écrinas através da difusão simples. Além disso, também foi descoberto que o

metabolito da L-dimetil-anfetamina é segregado no suor écrino após o seu consumo [150],[151]. Assim, a impressão latente pode conter vestígios de drogas devido ao consumo de tais substâncias e da sua integração no metabolismo.

Aplicou-se ToF-SIMS (espectrometria de massa de iões secundários com analisador por tempo de voo) também em pesquisas forenses para caracterização, visualização e análise de impressões digitais após contaminação por vestígios de anfetamina (AF), metanfetamina (MA), metilenodioximetanfetamina (MDMA ou ecstasy), resíduos de disparo, arsénico, níquel [152] [153].

Marples e seus colaboradores evidenciaram num estudo que os antibióticos (como é o caso da eritromicina) afetam a atividade da lipase bacteriana responsável pela hidrólise de triglicerídeos no sebo segregado na pele e, portanto, reduzem os níveis de ácidos gordos livres [154].

Croxton e seus colaboradores [143] verificaram que o conteúdo de aminoácidos difere entre os vegetarianos dadores ($n = 4$) e aqueles com dieta omnívora ($n = 14$). Nas amostras "naturais", a maioria dos aminoácidos era comparável. A quantidade média de alanina, glicina e serina foi maior para os dadores vegetarianos, embora não significativamente ($P > 0,1$). Estas diferenças não eram evidentes nas amostras "preparadas". Para os ácidos gordos, a composição foi comparável às amostras "naturais". O ácido pentadecanóico, no entanto, diferiu significativamente entre os omnívoros e vegetarianos ($P < 0,05$). Comparando as amostras "preparadas", as quantidades médias foram maiores nas amostras omnívoras em comparação com as vegetarianas. Diferenças marcantes foram evidentes para os ácidos hexadecanóico e *cis*-9-octadecenóico, embora uma diferença significativa tenha sido encontrada apenas para este último ($P < 0,01$).

A deteção de lubrificantes de preservativos tem sido alvo de inúmeros estudos [82],[89],[155]–[157]. A recuperação e identificação de vestígios associados ao uso de preservativo pode fornecer evidências importantes em casos de agressão sexual. Estas evidências vestigiais associadas ao uso do preservativo podem ser originárias do preservativo, do uso adicional de lubrificantes ou de ambos. A variedade de preservativos e lubrificantes pessoais disponíveis em todo o mundo é consideravelmente diversificada, e os componentes presentes num lubrificante podem variar significativamente entre marcas, ou até em variedades de uma marca particular. Em geral, preservativos e lubrificantes pessoais podem ser divididos em quatro tipos: de silicone, com base de PEG (polietileno glicol), de água e de óleo. Através de FTIR, Blackledge e seus colaboradores [158] detetaram o lubrificante polidimetilsiloxano (PDMS) e o nonoxinol-

9 (N9) que atua como lubrificante-espermicida, mas que também pode ser constituinte de outros produtos, desde cremes para a barba ou cremes desportivos.

Hollenbeck e seus colaboradores [158] investigaram os lubrificantes de preservativos através de zaragatoas vaginais por LC-ESI-MS e MALDI-FTMS. Em 2011, Spencer e seus colaboradores [95] utilizaram as tecnologias MALDI-ToF-MS e FTIR para detetar e diferenciar preservativos e lubrificantes. Neste mesmo ano, Bradshaw e seus colaboradores [84],[96] identificaram lubrificantes de preservativos em impressões digitais por MALDI-MSI e ATR-FTIR.

Capítulo 4

Espectrometria de Massa de Alta Resolução com Transformada de Fourier

- 4.1 Espectrometria de massa
- 4.2 História da Espectrometria de massa
- 4.3 Ionização por electrospray
- 4.4 Analisadores de massa de alta resolução
 - 4.4.1 FT-ICR
 - 4.4.2 Orbitrap
 - 4.4.3 FTICR vs Orbitrap

4 ESPECTROMETRIA DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

4.1 ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa é um método analítico que opera em fase gasosa, com o qual se podem obter dados sobre a massa molecular e a composição elementar, bem como informação estrutural das moléculas em estudo, recorrendo a espectrómetros de massa.

De uma forma geral, um espectrómetro de massa - como se ilustra na Figura 4.1, é constituído pelos seguintes componentes:

- sistema de introdução da amostra;
- fonte de iões;
- analisador (para a separação de iões de acordo com a sua razão m/z);
- detetor (que regista os sinais dos iões formados);
- sistema informático de aquisição e tratamento de dados.

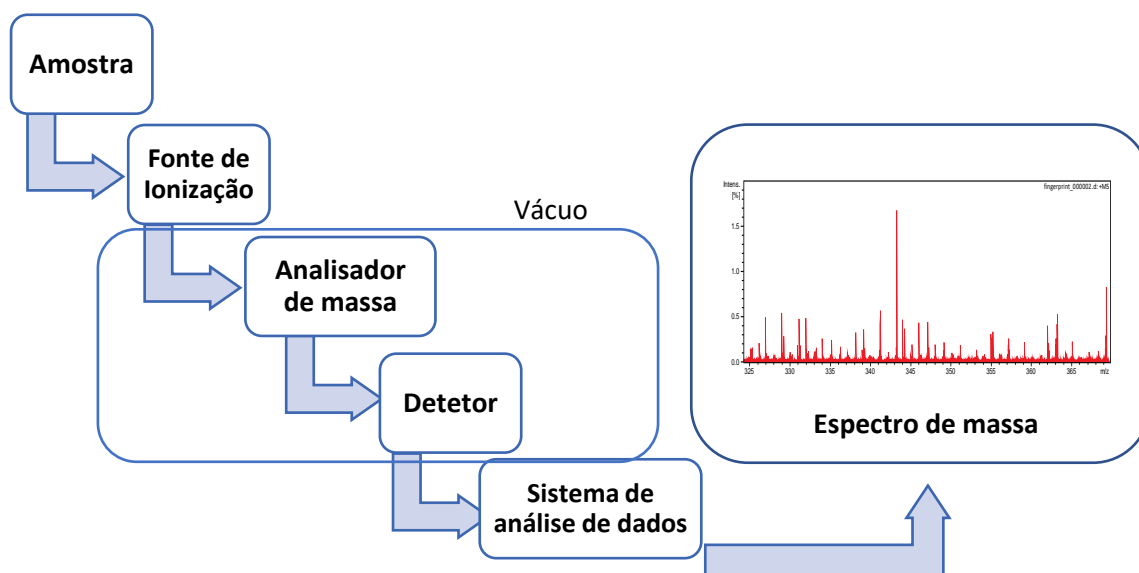


Figura 4.1 Esquema geral de um espectrómetro de massa.

A ionização em espectrometria de massa pode recorrer a técnicas tão diversas como a ionização eletrônica, a ionização química e a ionização de campo (as quais têm indicação para compostos termicamente estáveis e voláteis). No entanto, a maioria de compostos apresentam baixa pressão de vapor ou são termicamente instáveis, sendo que a ionização ocorre diretamente da fase condensada para a fase gasosa para estes analitos. No caso de amostras sólidas, líquidas ou gasosas, e tomando como exemplo um analito sólido adsorvido numa matriz sólida ou num fluido viscoso, a ionização pode ocorrer por meio da irradiação por partículas energéticas ou fótons, na superfície da matriz, para dessorver os iões, como por exemplo na ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI). Amostras em fase líquida podem ser nebulizadas à pressão atmosférica na fonte, para serem analisadas no espectrómetro de massa, método que se utiliza nas fontes de *electrospray* e, de certo modo, na fotoionização à pressão atmosférica. Em amostras em fase gasosa pode recorrer-se por exemplo à ionização química, na qual é utilizado um gás reagente para ionização. Neste trabalho recorreu-se à ionização por *electrospray* pelo que esta técnica será abordada com maior detalhe.

Da fonte de ionização, os iões passam para o analisador de massa, onde os iões são separados de acordo com a sua razão massa/carga (m/z) ou com alguma propriedade com ela relacionada. Para obtenção dos resultados analíticos deste estudo utilizaram-se o FT-ICR e o Orbitrap.

O detector é onde os iões, previamente separados pelo analisador, são convertidos num sinal elétrico (através de um sistema de deteção). Estes sinais são amplificados antes de serem reconvertidos em sinais digitais para processamento de dados, possibilitando várias funções como a calibração, reconstrução do espectro, quantificação automática, arquivo, criação e uso de bibliotecas de espectros. O método analítico em estudo culmina no registo da razão massa/carga e da abundância relativa de cada ião fragmento. A representação gráfica da abundância dos iões em função da razão m/z é designada por espectro de massa.

4.2 HISTÓRIA DA ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa tem uma história dinâmica marcada por seis prémios Nobel e avanços tecnológicos contínuos. Apesar de ter tido por base a física, a espectrometria de massa rapidamente evoluiu como técnica analítica em química, tendo nos últimos 35 anos abrangido também a biologia [159],[160].

Sir Joseph John Thomson da Universidade de Cambridge é considerado o pai da espectrometria de massa. Em 1897, Thomson realiza um conjunto de experiências, aplicando um campo elétrico ao um tubo de vidro em vácuo, observando uma deflexão do eletrão dentro do mesmo (Figura 4.2), sendo esta considerada uma das primeiras determinações da razão m/z . Estes estudos levaram Thomson a ganhar o prémio Nobel de Física em 1906.

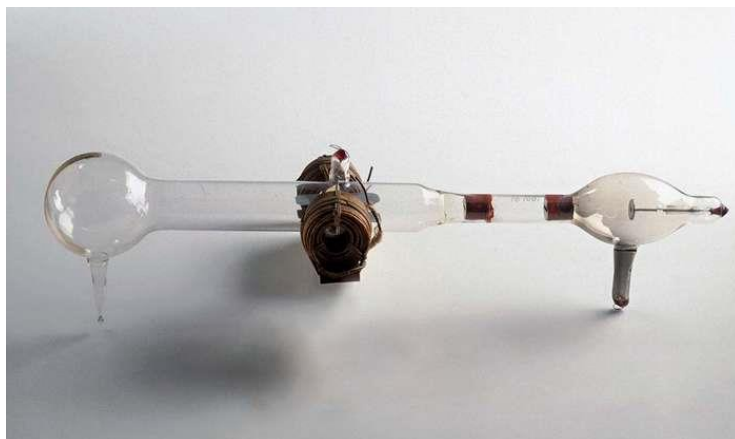


Figura 4.2 Tubo de raios catódicos usado por Sir J. J. Thomson, atualmente em exposição no Museu da Ciência em Londres [161].

Desde aí, o desenvolvimento da espectrometria de massa foi notório e profícuo, o que conduziu a vários prémios Nobel na comunidade científica (Figura 4.3).



J.J. Thomson
Física, 1906



Francis Aston
Química, 1922



Wolfgang Paul
Física, 1989



Hans Dehmelt
Física, 1989



John Fenn
Química, 2002



Koichi Tanaka
Química, 2002

Figura 4.3 Prémios Nobel relacionados com a espectrometria de massa [162].

No sistema desenvolvido por J. J. Thomson, um feixe de partículas positivas era desviado por um campo eletromagnético, formando curvas visíveis (parábolas), cada uma delas associada a um valor de razão m/z da partícula. F.W. Aston, um aluno assistente de J.J. Thomson,

aperfeiçoou o sistema desenvolvido por Thomson e introduziu um novo alinhamento dos campos eletromagnéticos, permitindo uma melhor focagem dos iões desviados sobre a placa fotográfica. Estas modificações culminaram no desenvolvimento do primeiro espectrógrafo de massa (Figura 4.4). Este equipamento conseguiu separar isótopos. O globo do espectrógrafo continha um composto ao qual era aplicada uma corrente elétrica. Mostrou nas suas experiências, com uma resolução de 2.000, que mais de 50 elementos eram compostos de átomos de diferentes massas atômicas, mas com os mesmos números atômicos.

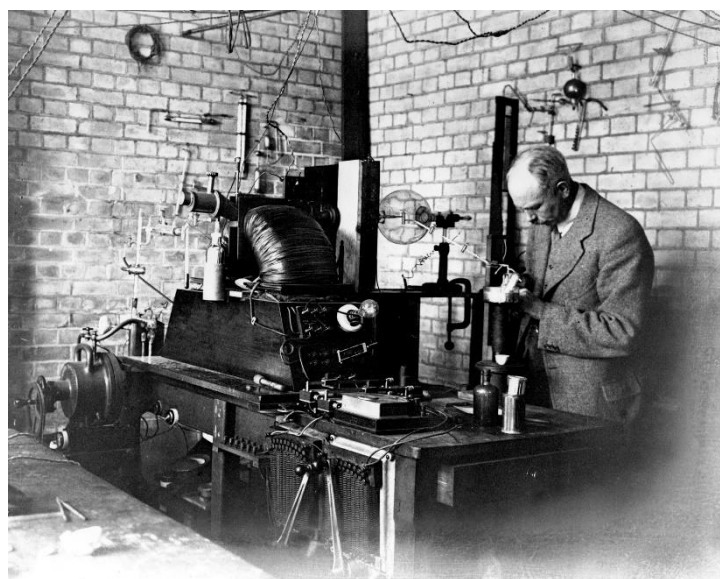


Figura 4.4 Primeiro espectrógrafo de massa [163].

A principal diferença entre o sistema de J. J. Thomson e o espectrógrafo de Aston residia na posição dos campos elétrico e magnético: no sistema inicial, estes eram aplicados de maneira perpendicular e simultânea, enquanto no espectrógrafo a sua aplicação era consecutiva e num mesmo plano. Em 1918, A. J. Dempster desenvolveu o primeiro espectrómetro de massa que usava fontes de ionização térmica e ionização electrónica. Aston recebeu o prémio Nobel da Química em 1922 pela descoberta de isótopos de vários elementos químicos. Wolfgang Paul e Hans Dehmelt receberam o prémio Nobel da Física em 1989 pelo desenvolvimento de uma *ion trap*. Nesta mesma data, o primeiro espectrómetro de massa com ionização por *electrospray* é comercializado. J. Fenn e K. Tanaka, em 2002, recebem o prémio Nobel da Química pelo desenvolvimento das técnicas de *electrospray* e MALDI.

A evolução da espectrometria de massa tem sido constante e as suas aplicações cada vez mais numerosas e variadas, como se representa na Tabela 4.1 [162].

Tabela 4.1 *Timeline* da evolução da Espectrometria de massa.

Ano	Investigador	Contribuição
1899-1911	Thomson	Primeiro espectrómetro de massa
1918	Dempster	Ionização electrónica e foco magnético
1919	Aston	<i>Atomic weights using MS</i>
1946	Stephens	Analizador ToF
1949	Hipple, Sommer, Thomas	Ressonância ciclotrónica de ião
1953	Johnson, Nier	<i>Double-focusing instruments</i>
1953	Paul, Steinwedel	Analizador quadrupolo
1956	Beynon	<i>High-resolution MS</i> Identificação de compostos orgânicos
1956	Golhke, McLafferty, Wiley, Harrington	GC-MS
1962	Castaing, Slodzian	MSI
1966	Biemann, Cone, Webster, Arsenault	Sequenciação de péptidos
1966	Munson, Field	Ionização química
1968	Dole	<i>Electrospray</i>
1969	Beckey	<i>Field desorption MS of organic molecules</i>
1974	MacFarlane, Torgerson	<i>Plasma desorption MS</i>
1974	Comisarow, Marshall	FT-ICR MS
1975	Carroll, Dzidic, Stillwell, Haegele, Horning	APCI
1977	Yost, Enke	Tripo quadrupólo
1981	Barber	FAB
1983	Tanaka, Karas, Hillenkamp	MALDI
1990	Chowdhury, Katta, Chait	<i>Protein conformational changes with ESI MS</i>
1991	Mann, Wilm	<i>MicroESI</i>
1991	Ganem, Li, Henion, Chait, Katta	Aplicação da ESI MS a complexos não covalentes
1993	Pieles, Zurcher, Schär, Moser	<i>Oligonucleotide ladder sequencing</i>
1993	Henzel, Billeci, Stults, Wong, Grimley, Watanabe	Mapeamento de proteínas
1996–2001	Siuzdak, Bothner, Fuerstenau, Benner	<i>Intact viral analysis</i>
1998	Zubarev, Kelleher, McLafferty	ECD
1999	Oda, Huang, Cross, Cowburn, Chait	Proteómica e Metabolómica com isótopos
2000	Makarov	Orbitrap
2002	Fenn	ESI
2003	Han, Gross	lipidómica <i>Shotgun</i>
2004	Takats, Wiseman, Gologan, Cooks	DESI
2004	Syka, Coon, Schroeder, Shabanowitz, Hunt	ETD
2005	Cody, Laramée, Durst	DART
2014	Wilhelm, Schlegel, Hahne	<i>Draft</i> do proteoma humano

Como não podia deixar de ser, tendo em conta o presente projeto, destacam-se os trabalhos de Comisarow e Marshall com a invenção do FT-ICR-MS, de Makarov com a invenção do Orbitrap, e dos trabalhos de Dole e Fenn no que respeita à ionização por *electrospray*.

Na década de 80, verificou-se a incapacidade da cromatografia líquida acoplar com a espectrometria de massa, em grande parte por as técnicas de ionização não conseguirem suportar o fluxo contínuo proveniente da cromatografia líquida. O aparecimento da ESI e da

APCI permitiram que a LC-MS seja realizada de forma rotineira. A contribuição de Fenn e dos seus colaboradores no desenvolvimento da ESI em conjunto com a espectrometria de massa, revolucionou a identificação e as análises estruturais de grandes moléculas biológicas. Fenn intitula o seu discurso do Prémio Nobel de “*Electrospray wings for molecules elephants*” [164]. O grande avanço de Marshall e Comisarow ocorreu quando perceberam que a FT poderia ser aplicada ao ICR. Desenvolveram um método de execução da FT que tornou o cálculo 1.000 vezes mais rápido do que havia sido relatado em 1965. Em 1985, o primeiro FT-ICR foi comercializado, pelas mãos da marca Nicolet [165]. Atualmente estes equipamentos são unicamente comercializados pela Bruker, existindo atualmente nos Estados Unidos dois equipamentos com um magneto de 21 Tesla. Nos últimos anos, verificou-se nesta técnica a implementação de métodos *data independent* para MSMS em substituição dos métodos *data dependent*. Em 2019, registou-se a utilização de 2D em proteómica [166], entre outros desenvolvimentos.

A tecnologia Orbitrap tem as suas raízes em 1923 quando Kingdon propôs o princípio da “*orbital trapping*”. Em meados dos anos 90, os esforços de Alexander Makarov avançaram no sentido de descobrir novas maneiras de alcançar alta resolução e precisão de massa, que culminaram em 1999 no primeiro analisador de massa Orbitrap com uma resolução de 150.000. É comercializado pela primeira vez em 2005. A introdução do espectrómetro de massa *Q Exactive*, em 2011, expandiu o alcance da espectrometria de massa com base em Orbitrap para análises de rotina em proteómica, metabolómica, ambiental e alimentar. Também em 2011, foi preparada a próxima geração Orbitrap Elite, onde os algoritmos de transformada de Fourier foram melhorados permitindo uma maior velocidade, maior resolução e melhor qualidade de análise para acompanhar a cromatografia de ultra-alta eficiência, bem como sobreposição de várias espécies de iões num único espectro de FT-MS [167].

4.3 IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*

A espectrometria de massa por *electrospray* para o estudo de moléculas biológicas foi introduzida em 1984 por Yamashita e Fenn [168],[169]. No entanto, o *electrospray* como fonte de iões em fase gasosa e a sua análise por espectrometria de massa surgiu bastante mais cedo, em 1968 por Dole [170].

Esta técnica apresenta inúmeras características que a permite diferenciar de outras existentes:

- produção de iões multiplamente carregados, reduzindo a razão m/z , de modo a que seja possível analisar compostos de massa molecular muito elevada;
- introdução das amostras a analisar em solução à pressão atmosférica, o que permite o acoplamento a técnicas de separação e a análise de compostos não voláteis ou termicamente instáveis;
- técnica de ionização suave, que permite que as interações não covalentes entre moléculas em solução não sejam destruídas na fase gasosa.

Devido a estas características, a espectrometria de massa por *electrospray* é usada no estudo de processos intermoleculares, bem como no estudo de compostos de elevada massa molecular de todos os tipos (por exemplo, proteínas e polímeros sintéticos), e também como sistema de deteção para cromatografia líquida.

A espectrometria de massa por *electrospray* requer amostras diminutas, permitindo análises rápidas, o que a torna bastante popular e de interesse crescente em diversas áreas de investigação e na indústria [171].

As soluções a analisar são colocadas numa seringa cuja válvula de injeção as transfere para a fonte de ionização, à pressão atmosférica, onde as moléculas do analito são ionizadas por *electrospray*.

A técnica de ionização por *electrospray* permite a transferência de iões pré formados na solução para a fase gasosa e/ou a formação de iões na fase gasosa, na qual os iões são sujeitos a análise de massa. Esta transferência de iões da solução para a fase gasosa é um processo fortemente endoenergético, porque em solução o ião interage fortemente com um determinado número de moléculas de solvente que formam uma esfera de solvatação em torno do ião.

Existem três passos principais na produção de iões em fase gasosa por *electrospray* a partir dos iões eletrólitos em solução [172]:

1. produção de gotas carregadas na ponta do capilar de *electrospray*;
2. divisão das gotas carregadas por evaporação do solvente e por desintegrações repetidas das gotas, até originarem gotas carregadas cada vez mais pequenas capazes de produzir iões em fase gasosa;
3. mecanismo pelo qual os iões em fase gasosa são produzidos.

Foram propostos dois mecanismos para a formação de iões em fase gasosa a partir de gotas muito pequenas e extremamente carregadas, como se ilustra na Figura 4.5.

O primeiro, o modelo de resíduo de carga, foi proposto por Dole. Neste mecanismo dá-se a formação de gotas extremamente pequenas que deverão conter um único ião. A evaporação do solvente de uma gota conduz a um ião em fase gasosa. Iribarne e Thomson [173] propuseram o modelo da evaporação iónica. Este mecanismo sugere que após o raio das gotas diminuir até um determinado tamanho, é possível a emissão direta de um ião a partir dessas mesmas gotas. Este processo é dominante após fissão coulombiana para gotas com raio $R \leq 10\text{nm}$. Este último mecanismo também foi estudado por Fenn, que propôs que uma parte da molécula carregada pudesse penetrar na superfície da gota devido a um movimento browniano. A molécula sairia da gota através da repulsão coulombiana existente entre a parte da molécula carregada e a superfície da gota.

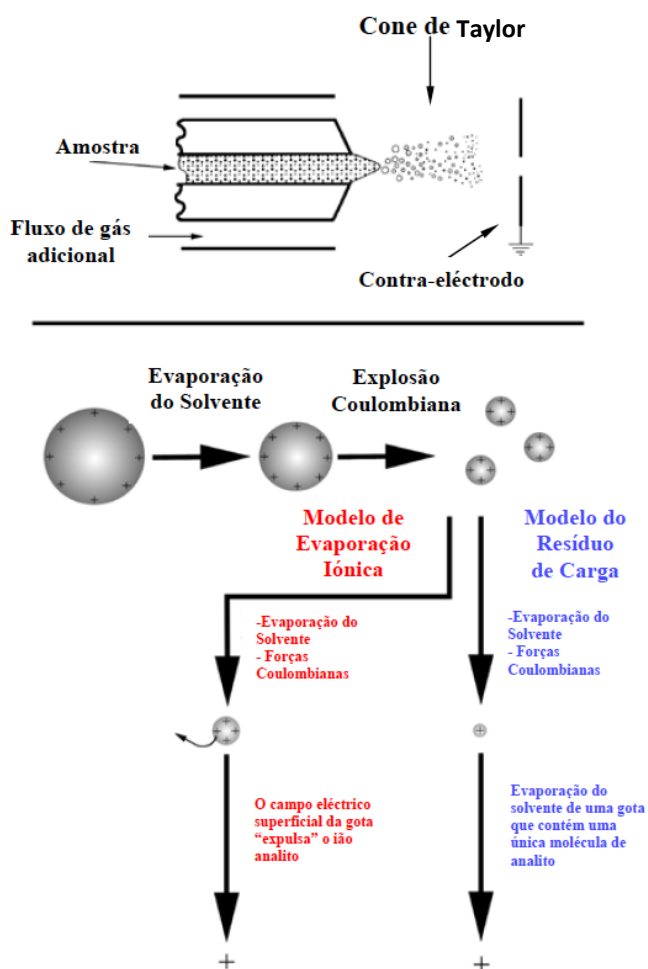


Figura 4.5 Esquema dos mecanismos propostos para a produção de iões em fase gasosa.

Gomez e Tang obtiveram imagens de gotículas formadas e divididas numa fonte ESI. A partir das suas observações, concluíram que a divisão das gotículas pode ocorrer antes que o limite indicado pela equação de Rayleigh seja atingido, visto as gotículas serem deformadas mecanicamente, reduzindo assim a repulsão necessária para as dividir [174].

A equação de Rayleigh refere que:

$$q^2 = 8\pi^2 \cdot \epsilon_0 \cdot \gamma \cdot D^3 \quad (\text{Equação 4.1})$$

onde q é a carga, ϵ_0 a permissividade do meio, γ a tensão superficial, e D o diâmetro da gota (na sua aproximação a uma esfera).

A gota alonga-se sob a força resultante do acúmulo de carga, semelhante ao que ocorre na ponta do nebulizador, produzindo um novo cone de Taylor. A partir deste cone de Taylor, são libertadas cerca de 20 gotículas menores. Normalmente, uma gota de primeira geração do capilar terá um diâmetro de cerca de 1,5 μm e transportará cerca de 50 000 cargas elementares [175].

O processo eletroquímico na interface líquido/metal foi demonstrado por Blades e seus colaboradores. A oxidação eletroquímica que ocorre no capilar de electrospray tem implicações analíticas pois os catiões radicais podem ser gerados a partir de analitos neutros, permitindo assim em situações específicas o uso de electrospray como um verdadeiro método de ionização.

Todo o processo e mecanismo relativo à produção de iões ocorre entre o capilar e o contra-eléctrodo, à pressão atmosférica. Estes iões que se formam passam através de um cone ou orifício, por acção de um campo eléctrico, para uma zona intermédia mantida a uma pressão mais baixa.

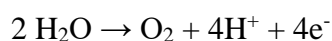
Tendo em conta que além da produção de iões, também há a produção de agregados de iões de analito e solvente, é conveniente a aplicação de um fluxo de gás neutro co-axial na ponta da agulha, permitindo uma maior eficácia na dessolvatação do spray, ou a colocação do capilar da fonte ligeiramente desalinhada em relação à entrada do espectrómetro de massa, ficando deste modo alinhada com uma região mais exterior do spray e, portanto, mais rica em gotas mais pequenas e dessolvatadas.

A ionização por electrospray é considerada por vários autores um processo electroquímico. A fonte de iões por electrospray é constituída, de um modo geral, por dois eléctrodos: um capilar metálico (eléctrodo de trabalho, nebulizador) sujeito a voltagens positivas e negativas elevadas

(respetivamente nos modos de iões positivo e negativo), e por um contra-eléctrodo. A pulverização da solução ocorre devido à diferença de potencial aplicado entre os dois eléctrodos [176]. Quando a formação de um excesso de iões de uma determinada polaridade na superfície de um líquido atinge o ponto em que as forças repulsoras coulombianas (resultantes do campo eléctrico entre a superfície líquida e o contra-eléctrodo) são suficientes para superar a tensão superficial do líquido, dá-se a emissão no capilar de gotas enriquecidas numa polaridade iónica. Esta condição resulta numa corrente permanente no contra-eléctrodo com uma direcção consistente com a polaridade de voltagem aplicada ao capilar. Para que esta contínua perda de polaridade iónica em gotas carregadas seja suspensa, deve neutralizar-se a formação de cargas opostas no capilar por forma a manter o equilíbrio de cargas. Este processo de equilíbrio envolve a oxidação-redução eletroquímica dos componentes do emissor metálico de eletrospray e/ou de uma ou mais espécies na solução, levando por fim a um fluxo de electrões de, ou para, a fonte de alta tensão dependendo da polaridade aplicada ao capilar [177].

Enquanto as reacções de oxidação ocorrem na fonte de eletrospray no modo positivo, as reduções ocorrem no modo negativo. À medida que as espécies iónicas da amostra emergem do capilar de ionização por electrospray, sofrem um movimento eletroforético como resposta ao campo eléctrico imposto. No modo positivo, os aniões migram em direcção ao capilar metálico de ionização por electrospray (potencial relativamente positivo), enquanto que os catiões se afastam do capilar metálico na direcção do contra-eléctrodo. O campo eléctrico que “empurra” os iões positivos é contrabalançado pela tensão superficial do líquido. Em campos eléctricos altos e suficientemente fortes, forma-se um cone dinâmico de líquido (cone de Taylor) no capilar de saída [178].

Devido às diferenças de voltagem entre o capilar de ionização por ES e o contra-eléctrodo, ocorrem reacções de oxidação na interface metal-solução do capilar de ionização por ES. Tais processos oxidativos (no modo positivo) podem tomar diversas formas, como seja a produção de H^+ a partir da água:



$$E^0_{(vs \text{ eléctrodo de hidrogénio padrão})} = 1,229 \text{ V}$$

No modo negativo, a direcção dos movimentos eletroforéticos dos aniões e dos catiões é inversa da explicada anteriormente, ocorrendo reacções de redução no capilar de ionização por electrospray. Estas reacções eletroquímicas servem essencialmente para a produção contínua de gotas carregadas de uma dada polaridade. De forma similar, no contra-eléctrodo, onde há uma

contínua chegada de espécies carregadas de uma polaridade, é necessário que ocorra uma segunda reação eletroquímica.

No modo positivo, a segunda reação deverá ser uma redução; logicamente, a reação no contra-eléttrodo no modo negativo será uma oxidação. Quando a segunda reação ocorre, completa-se um tipo especial de circuito elétrico. De acordo com tudo isto, Kebabler e seus colaboradores reconheceram a fonte de eletrospray como um tipo especial de célula eletrolítica onde a eletrólise mantém o balanço de cargas, de forma a permitir a produção contínua de gotas carregadas [179].

A correlação entre a concentração do analito e a intensidade do sinal para soluções de componente único e duplo foi sistematicamente estudada por Tang e Kebabler [180]. Para soluções de componente único, o sinal de *electrospray* aumenta linearmente com a concentração em três ordens de magnitude antes de se estabilizar. Esse efeito de saturação é provavelmente causado pelo esgotamento das nano-gotículas livres de analitos geradas pelo spray, que dão origem a iões moleculares e/ou moléculas protonadas. Uma fonte de *electrospray* de baixo fluxo (ou mesmo a fonte de *nanoelectrospray*) gerará gotículas iniciais menores e mais nanopartículas por volume pulverizado, obtendo-se uma maior gama dinâmica e sensibilidade.

4.4 ANALISADORES DE MASSA DE ALTA RESOLUÇÃO

Nos analisadores de massa de alta resolução, os iões produzidos na fonte passam por um *skimmer* e são conduzidos ao analisador através de campos eléctricos criados com diferentes geometrias, genericamente designados por óptica de iões e num gradiente de vácuo. Podem incluir *ion-funnels*, *ion-guides*, hexapolos, quadrapolos, num leque de configurações muito variáveis em instrumentação comercial. As cinco principais características para medir o desempenho de um analisador de massa são [175]:

- ✓ intervalo de m/z ;
- ✓ velocidade de aquisição por espectro;
- ✓ transmissão;
- ✓ exactidão de massa;
- ✓ resolução.

O intervalo de massa determina o limite de m/z sobre o qual o analisador de massa pode detectar iões. Em Espectrometria de massa a carga é indicada em múltiplos da carga elementar ou a carga de um electrão em valor absoluto ($1 e^- = 1,602177 \times 10^{-19} \text{ C}$) e a massa é indicada em unidades de massa atómica, em que 1 u ou $1 \text{ Da} = 1,660540 \times 10^{-27} \text{ Kg}$. Assim, a propriedade física medida é a razão massa/carga. Em 1991, foi proposto por Cooks e colaboradores [181] uma nova unidade, o Thomson (Th), em que $1 \text{ Th} = 1 \text{ u}/e^- = 1,036426 \times 10^{-8} \text{ KgC}^{-1}$. O tempo de análise, também denominado velocidade de varrimento, é a taxa de varrimento num intervalo de massa específico. É expresso em unidades de massa por segundo (u s^{-1}). A transmissão é a razão entre o número de iões que são detetados e o número de iões produzidos na fonte de ionização. A exatidão da massa é a diferença observada entre o valor de m/z teórico e o valor de m/z experimental. Por último, a resolução é a capacidade de um analisador de massa produzir sinais distintos para dois iões com uma pequena diferença de m/z .

Existem sete tipos de analisadores de massa, descritos de forma sucinta quanto ao princípio de separação na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Tipos de analisadores de massa [175].

Analisador de massa	Princípio de separação
Setor Elétrico (E)	Energia cinética
Setor Magnético (B)	Energia cinética
Quadrupolo (Q)	Estabilidade da trajetória (m/z)
<i>Ion trap</i> (IT)	Frequência de ressonância (m/z)
Tempo de voo (ToF)	Tempo
Ressonância ciclotrónica de ião com transformada de Fourier (FT-ICR)	Frequência de ressonância (m/z)
Orbitrap	Frequência de ressonância (m/z)

Neste projeto foram utilizados os analisadores FT-ICR e Orbitrap, que se descrevem com maior detalhe nos dois sub-capítulos seguintes.

A espectrometria de massa teve um enorme desenvolvimento a partir de 1995 com o aparecimento de novas fontes de ionização e de equipamentos híbridos, bem como de novos analisadores, potenciando e alargando as suas aplicações [175]. Porém, a espectrometria de massa de resolução extrema teve um avanço em 1974 com a aplicação de um novo sistema de

deteção de iões que, através da aplicação de uma transformada de Fourier, permitia obter um espectro de massa de muito elevada resolução num curto intervalo de tempo [182].

De igual modo, a utilização de um campo magnético estático e a separação efetiva entre a excitação e a deteção conduziu a grandes melhorias de eficiência, particularmente ao nível da resolução [182],[183]. A alta capacidade de resolução de MS é necessária para separar os picos adjacentes uns dos outros, garantindo que apenas um tipo de ião contribui para o sinal observado, o que é relevante na separação de iões isobáricos e na análise de misturas extremamente complexas. Não existe propriamente uma classificação estabelecida para a alta resolução em espectrometria de massa, sendo comuns os termos HRMS (*high resolution mass spectrometry*) e HRAM (*high resolution accurate mass*). Qualquer instrumento com uma resolução entre 50.000 a 100.000 e uma exactidão de massa de pelo menos 1 ppm pode enquadrar-se nesta categoria, que cobre a maior parte dos Q-ToF e Orbitraps. Os instrumentos de FTMS podem, no entanto, alcançar rotineiramente resoluções muito superiores. Os modelos mais recentes de Orbitrap atingem resoluções de 500.000 ou 1.000.000 a m/z 200, com uma exactidão de massa de 1 ppm ou inferior, dependendo da calibração. O FT-ICR está numa classe à parte, com uma exactidão de massa na casa dos ppb e uma resolução de 1.000.000 a m/z 1000, com um magneto de 7 Tesla. No entanto, mesmo a 7 Tesla de campo é possível atingir um poder de resolução de 24.000.000 a m/z 177 [184]. Desenvolvimentos na compreensão da dinâmica de iões sob a acção de campos eléctricos e magnéticos permitiram alcançar com um magneto de 4.7 Tesla uma resolução de 12.000.000 a m/z 675 [185]. Por outro lado, um incremento significativo do magneto para 9,4 Tesla permitiu demonstrar uma resolução da linha de base de isotómeros de aproximadamente 1 Da [186].

A combinação de massa exacta, resolução da estrutura fina dos iões e fidelidade isotópica permitem estabelecer de forma inequívoca a fórmula de composição elementar para pequenas moléculas.

4.4.1 FT-ICR

Os analisadores de massa de ressonância ciclotrónica de ião com transformada de Fourier (FT-ICR) são os analisadores de massa mais avançados em termos de exactidão de massa e resolução [187]. A espectrometria de massa FT-ICR é uma técnica de análise de massas que

consiste no confinamento e detecção de iões numa região do espaço definida por um campo magnético e um campo elétrico homogêneos. Mostra-se na Figura 4.6 uma célula ICR.

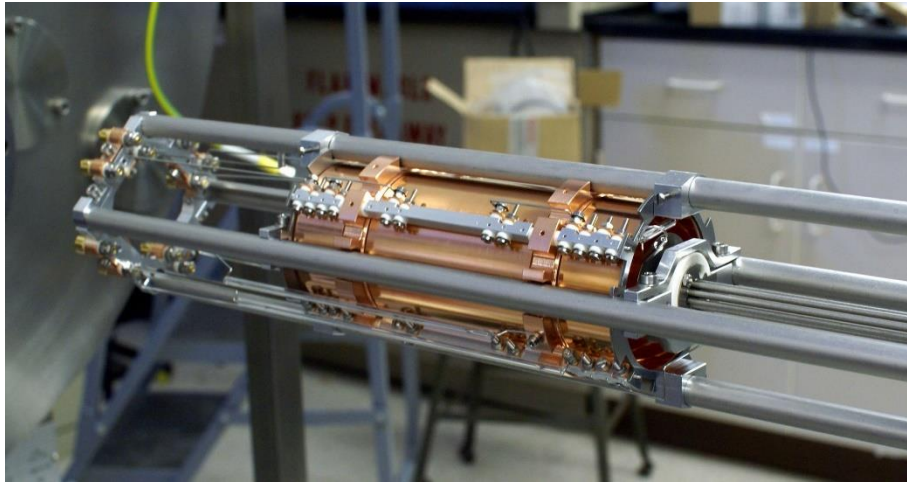


Figura 4.6 Célula ICR cilíndrica com revestimento a cobre, onde os iões entram na célula pelo lado direito [188].

A espectrometria de massa FT-ICR determina a relação m/z de iões, medindo a frequência de ressonância ciclométrica de iões num campo magnético homogêneo e estático. O método difere significativamente de outros tipos de espectrometria de massa, em que os iões são indiretamente detetados pela medição da frequência de ciclotrão (rotacional) que eles produzem quando giram num campo magnético.

Nos instrumentos FT-ICR, um ião de massa m e carga q é submetido a um campo magnético axial homogêneo B , e a um campo elétrico quadrupolar E , derivado de um potencial V , onde

$$V = V_0(z^2 - \rho^2/2)/2d^2 \quad (\text{Equação 4.2})$$

com $d^2 = (z_0^2 + \rho_0^2/2)/2$, onde ρ_0 é a coordenada polar no plano xy .

O movimento deste ião resulta da superposição de uma oscilação axial devido à tensão de retenção V_0 nas placas terminais, separada por uma distância d com frequência, ω_z , onde

$$\omega_z = (zV_0/md^2)^{1/2}, \quad (\text{Equação 4.3})$$

um movimento de ciclotrão com frequência

$$\omega_c = qB/m, \quad (\text{Equação 4.4})$$

e um movimento de magnetrão com frequência

$$\omega_m = \omega_z^2 / 2\omega_c. \quad (\text{Equação 4.5})$$

Pode demonstrar-se que:

$$\omega_m \ll \omega_z \ll \omega_c$$

de modo que o movimento do magnetrão tem um raio muito maior do que o movimento do ciclotrão [189].

Os iões são mantidos numa *Penning trap* (um campo magnético com placas de captura elétricas), onde são excitados (nas suas frequências ressonantes de ciclotrão) para um raio maior de ciclotrão, por um campo elétrico oscilante ortogonal ao campo magnético. Após a remoção do campo de excitação, os iões giram na sua frequência de ciclotrão na fase (como um "pacote" de iões) (Figura 4.7). Esses iões induzem uma carga (detetada como uma corrente eléctrica oscilante, com atenuação de intensidade ao longo do tempo) num par de eléctrodos à medida que os “pacotes” de iões passam perto deles. O sinal resultante é chamado de decaimento de indução livre (FID), consistindo numa superposição de ondas sinusoidais.

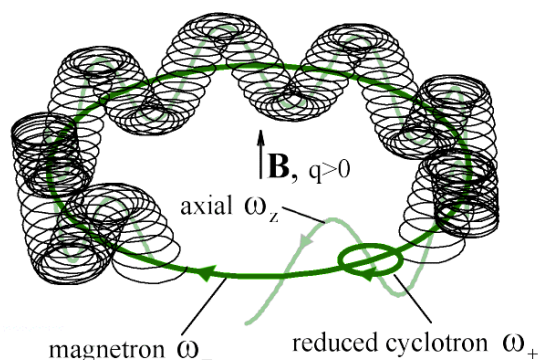


Figura 4.7 O movimento do ião numa *Penning trap* ideal é uma superposição do movimento reduzido do ciclotrão (ω_+), do movimento do magnetrão (ω_-) e de uma oscilação harmónica (ω_z) na direcção do campo magnético [190].

No FT-ICR MS, a resolução e exactidão de massa podem ser melhoradas linearmente aumentando a intensidade do campo magnético. Ou aumentando o tempo de aquisição do sinal transiente, que pode variar entre menos de um segundo até alguns minutos. Na realidade, não existe um limite superior nem de tempo nem de resolução, dependendo do decaimento da própria FID. O sinal útil é extraído desses dados executando uma FT para transformar um espectro de frequências num espectro de massa.

De uma forma geral, para realizar uma experiência FT-ICR MS são necessários os seguintes passos:

- formação de iões na fonte de ionização;
- acumulação de iões;
- transporte dos iões para a *Penning trap*;
- seleção dos iões com base na razão m/z e ejeção destes para fora da *trap*;
- excitação;
- deteção (o detetor mede a frequência ciclotrónica de todos os iões);
- rápida transformada de Fourier do sinal digital;
- conversão da frequência em m/z .

Mostra-se na Figura 4.8 o diagrama esquemático do FT-ICR Bruker Apex.

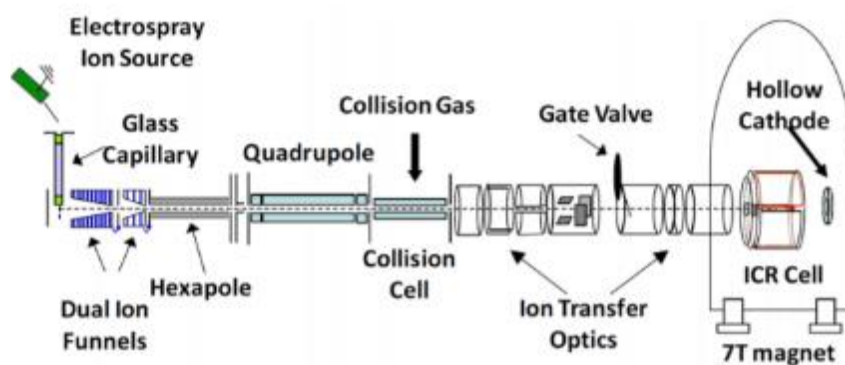


Figura 4.8 Diagrama de um equipamento FT-ICR MS (Bruker Apex) [191].

O FT-ICR MS pode alcançar níveis mais altos de resolução do que outras formas de espectrometria de massa usando um ímã supercondutor. A resolução de massa é muito elevada (resolução de 24.000.000 com um magneto de 7 Tesla, para um transiente de três minutos, a m/z 177) [184] e uma exactidão de massa melhor que 1 ppm abre possibilidades únicas para a identificação de analitos desconhecidos. O sistema fornece a maior resolução de massa possível de todos os espectrómetros de massa na atualidade. A resolução de massa depende da intensidade do campo magnético e do tempo de aquisição, e os sistemas que aplicam maiores intensidades de campo magnético podem fornecer resoluções de massa superiores. Precisões de massa medidas em unidades de ppb também são facilmente alcançadas, dependendo da

calibração de massa, o que, combinado com a estrutura isotópica fina permite a determinação inequívoca da fórmula molecular [192].

A técnica de ionização mais comumente usada com o FT-ICR MS é a ionização por *electrospray* (ESI) [193]. No entanto, é dos poucos instrumentos com os quais qualquer fonte de ionização pode ser acoplada, desde todas as técnicas a pressão atmosférica (APCI, APPI, nanoESI, DESI e nanoDESI) como também outras técnicas de ionização como a chamada DART (*Direct Analysis in Real Time*) [194] e MALDI [195]. Os métodos clássicos de ionização química e electrónica também podem ser usados, acoplando assim o FT-ICR ao GC-MS.

Marshall e seus colaboradores publicaram exemplos, mostrando a resolução de mais de 10.000 espécies moleculares distintas num único espectro de massa [196]. Com base apenas no poder resolutivo, os analisadores FT-ICR MS têm claramente a capacidade analítica necessária para analisar o metaboloma dos mamíferos, estimado por conter mais de 3.000 componentes, sem a necessidade de separação cromatográfica dos componentes [197], contudo é importante realçar que a base de dados HMDB contém mais de 100.000 compostos.

Face a estas características diferenciadoras, desde o seu aparecimento no mercado, o FT-ICR provou a sua aplicabilidade, de forma diferenciada, na análise e caracterização de moléculas [198]–[202]. Mas o FT-ICR MS tem ainda outras vantagens, nomeadamente a multiplicidade de métodos de ionização e uma grande diversidade de métodos de fragmentação, sem limite de profundidade de MSMS, fundamentais para estudos estruturais. A medição exacta da massa pelo FT-ICR MS tem sido amplamente demonstrada para a caracterização de metabolitos desconhecidos pela atribuição inequívoca de fórmulas elementares [198],[203],[204]. A nível forense são ainda poucos os trabalhos efetuados com recurso a resolução extrema devido ao seu custo e manutenção serem bastante elevados. É necessário ainda um muito elevado nível de treino para a operação destes instrumentos.

4.4.2 ORBITRAP

O Orbitrap é uma armadilha de íons eletrostática que usa a transformada de Fourier para obter espectros de massa. Este analisador é baseado num conceito completamente novo, proposto por Makarov, e descrito em patentes nos anos de 1996 e 2004, e na revista científica *Analytical Chemistry*, em 2000. Uma terceira patente descreve um instrumento completo, incluindo uma fonte de pressão atmosférica [205]. O primeiro instrumento comercial foi introduzido no mercado pela *Thermo Electron Corporation* em junho de 2005.

O analisador de massa Orbitrap é inspirado na *Kingdon trap*. A *Kingdon trap* utiliza um campo puramente eletrostático para captura de íons, não usando campos magnéticos ou campos elétricos dinâmicos. Consiste num elétrodo central de fio fino, um elétrodo cilíndrico externo coaxial eletricamente isolado e dois elétrodos [206].

Uma corrente contínua é aplicada entre dois elétrodos axialmente simétricos, resultando numa distribuição de potencial eletrostático.

A equação do potencial dentro da armadilha é representada por:

$$U(r, z) = k/2 (z^2 - r^2/2) + k/2 (R_m)^2 \ln(r/R_m) + C \quad (\text{Equação 4.6})$$

Nesta equação, r e z são as coordenadas cilíndricas ($z = 0$ sendo o eixo de simetria do campo), C é uma constante, k é a curvatura do campo, e R_m é o raio característico.

O primeiro termo é um campo quadrático e o segundo o campo logarítmico de um condensador cilíndrico. A análise desta equação mostra que a coordenada z aparece apenas num termo. Assim, o gradiente de tensão na direção z é

$$\partial U(r, z) / \partial z = kz \quad (\text{Equação 4.7})$$

Um ião com massa m , carga total $q = ze$ é acelerado ao longo de z , resultante da força induzida pelo campo elétrico. A força elétrica $-qkz$ é igual ao produto da massa pela aceleração,

$$m (d^2z/dt^2); \quad (\text{Equação 4.8})$$

Logo,

$$F_z = m (d^2z/dt^2) = -q (\partial U / \partial z) = -qkz \quad (\text{Equação 4.9})$$

ou,

$$d^2z/dt^2 = -q/m (kz) \quad (\text{Equação 4.10})$$

Esta equação descreve um oscilador harmónico simples, como um pêndulo. Introduzindo um fator de energia E_z definido por

$$qE_z = (m/2) (dz_0/dt)^2 \quad (\text{Equação 4.11})$$

a solução exata da equação 4.10 apresentada anteriormente será

$$z(t) = z_0 \cos \omega t + \sqrt{(2E_z/k)} \sin \omega t \quad (\text{Equação 4.12})$$

com

$$\omega = \sqrt{(q/m)k} \quad (\text{Equação 4.13})$$

Esta equação mostra que a frequência está diretamente ligada à razão m/z e é independente da energia cinética dos iões injetados. Esta é uma propriedade muito importante do Orbitrap. A corrente induzida pelos iões oscilantes é medida e convertida por uma transformada de Fourier nas frequências e intensidades individuais, produzindo o espectro de massa. Após 2008 foi construído um espectrómetro de massa Orbitrap (*Exactive*), em que a fonte de iões está diretamente ligada à *C-trap* (Figura 4.9).

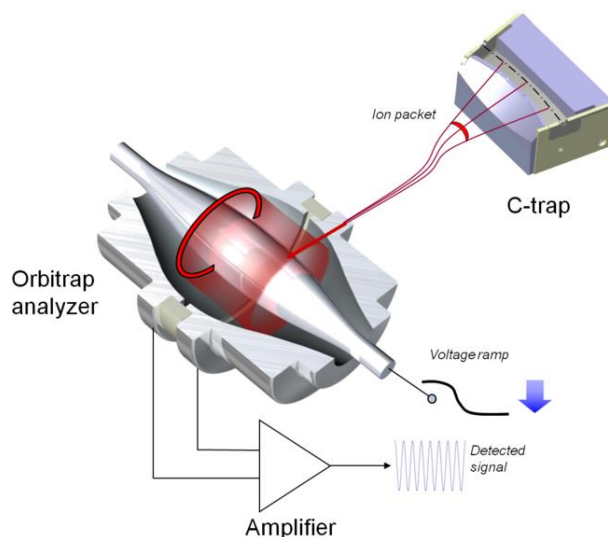


Figura 4.9 Seção transversal do *C-trap* e do analisador Orbitrap (ótica de iões e bombeamento diferencial não mostrado). O “pacote” de iões entra no analisador durante a rampa de tensão formando anéis que induzem a corrente detetada pelo amplificador (*Thermo Fisher Scientific*) [207].

Em 2011, uma combinação deste dispositivo com um analisador de massa quadrupolo foi lançado sob o nome de *Q Exactive* (Figura 4.10), tornando-se popular na proteômica, podendo inclusive vir a substituir os triplos quadrupolos neste tipo de análise [208].

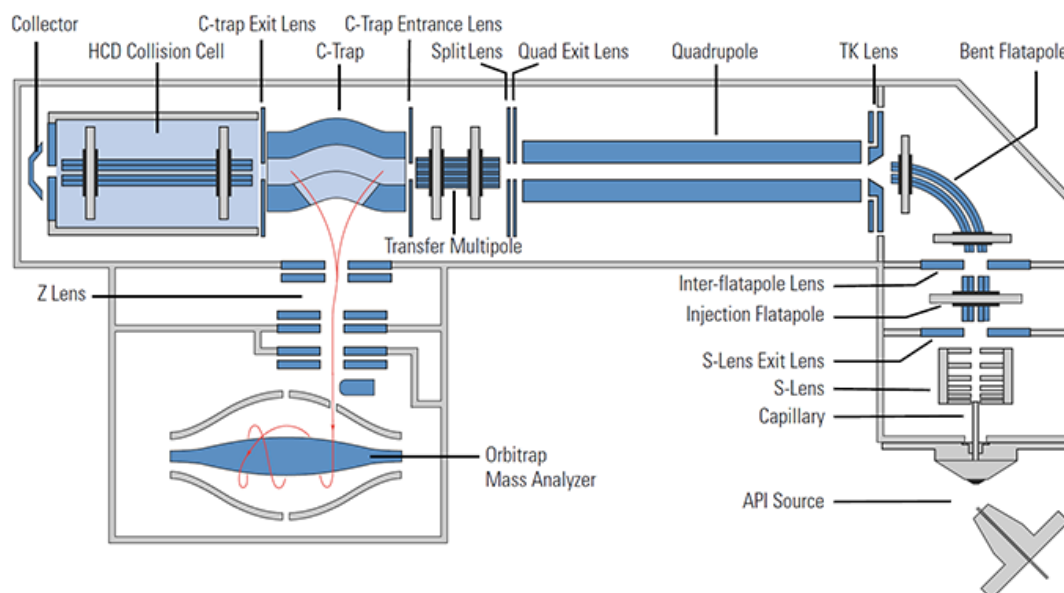


Figura 4.10 Diagrama de um Orbitrap Q Exactive [207].

Todos os espectrômetros de massa comerciais Orbitrap utilizam uma armadilha linear curva para injeção de íons (*C-trap*). Ao reduzir rapidamente as tensões de retenção de radiofrequência e aplicar gradientes de corrente contínua ao longo da *C-trap*, os íons podem ser agrupados em pacotes curtos semelhantes aos da fonte de íons de laser.

Os métodos de dissociação MSMS mais utilizados em equipamentos Orbitrap são a dissociação induzida por colisão (*Collision-induced dissociation CID*) e a dissociação *C-trap* de alta energia (*Higher-energy C-trap dissociation HCD*) [209]. CID refere-se ao processo pelo qual um íon e uma espécie neutra (por exemplo, hélio, azoto ou árgon) colidem, e a energia dessa colisão é transferida para a energia interna do íon, resultando numa quebra e fragmentação das ligações. Esses fragmentos são então acelerados em direção ao analisador de massa. Os fragmentos moleculares e/ou atômicos saem da célula de colisão e são analisados por um detector.

Os espectrômetros de massa Orbitrap com triplo quadrupolo (QQQ) utilizam o método MSMS CID para fragmentar amostras nos seus componentes básicos. O primeiro Q (Q1) do triplo quadrupolo normalmente consiste num filtro de massa, que seleciona um determinado íon e o acelera em direção à célula de colisão (Q2) do equipamento, onde é fragmentado. Depois de

sair do Q2, os intervalos de massa dos fragmentos são analisados pelo terceiro quadrupolo (Q3). A HCD refere-se a uma variação da CID que utiliza uma tensão de RF mais alta para reter iões fragmento na C-trap. A célula HCD, observada no esquema da Figura 4.10, é usada para fragmentar os iões, após os quais são acelerados, arrefecidos e armazenados dentro da *C-trap*. Os iões são injetados e separados dentro do Orbitrap com base nas suas diferenças de frequência de rotação.

4.4.3 FT-ICR vs Orbitrap

Muitas comparações foram já efetuadas entre o Orbitrap e o FT-ICR, uma questão muito relevante dadas as vastas diferenças que existem entre ambos e o facto de se tratarem de instrumentos com um único fabricante para cada. O FT-ICR tem uma origem mais antiga e, durante décadas, um desempenho sem rival no domínio da resolução, exactidão de massa, profundidade de MSMS, multiplicidade de métodos de fragmentação e manipulação de iões na *trap*. Os dois analisadores são comparáveis em sensibilidade e gama dinâmica. Uma das principais diferenças é a capacidade de manipular, excitar e desexcitar iões no FT-ICR, a profundidade ilimitada de MSMS sempre em extrema resolução e a variedade de métodos de MSMS *Sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation* (SORI-CID) [210], *Electron Capture Dissociation* (ECD) [211], *Infrared multiple photon dissociation* (IRMPD) [212], *Ultra-Violet Photodissociation* (UVPD)[213], *Blackbody Infrared Radiative Dissociation* (BIRD) [214]. No Orbitrap, a fragmentação de iões pode ser gerada a qualquer nível de MS^n por HCD e CID. Em alguns instrumentos, é possível usar *Electron Transfer Dissociation* (ETD), *Electron-transfer/higher-energy collision dissociation* (EthcD) e UVPD [215]. Uma diferença física fundamental entre estes analisadores tem consequências na forma como a resolução diminui em função do aumento de m/z . A resolução do FT-ICR é inversamente proporcional à razão m/z , enquanto a resolução do Orbitrap é inversamente proporcional à raiz quadrada de m/z e, portanto, diminui de forma mais atenuada com o aumento de m/z . No entanto, como é sempre possível aumentar a resolução no FT-ICR aumentando o tempo de aquisição, esta aparente desvantagem é facilmente anulada. Recentemente foram desenvolvidos métodos computacionais que permitem recriar um espectro de resolução extrema em toda a gama de m/z por concatenação de espectros de extrema resolução em intervalos curtos de m/z . Este método, denominado de *spectral stitching* permite

efectivamente manter a resolução em todo o espectro [209]. No entanto, apesar de conceptualmente possível, ainda não foi implementado no Orbitrap.

Segundo Zubarev e MaKarov [216], a maior vantagem do analisador FT-ICR talvez seja a sua capacidade de aceitar iões com energias baixas e muito baixas e, prendê-los praticamente indefinidamente (muitas horas), sujeitando-os a uma variedade de excitações (UV, IV, entre outras), bem como a reações ião-ião e ião-espécie neutra. Além disso, permite a selecção de um ião precursor no analisador FT-ICR com alta resolução, por exemplo, isolar um único isotopómero de uma molécula de elevada massa, excitá-lo e analisá-lo e, em seguida, desexcitar e reanalisar. Essa flexibilidade está ausente no analisador Orbitrap, onde iões de alta energia colidindo com espécies neutras ou outros iões, ou submetidos a dissociação unimolecular, são geralmente perdidos apenas alguns segundos após a injeção. Por outro lado, o analisador Orbitrap possui uma característica única em relação ao método de oscilações axiais de excitação. Tal obtém-se injetando pacotes de iões pulsados na armadilha tangencialmente a uma fenda no eléctrodo externo. A posição da fenda relativamente ao centro da armadilha define a amplitude das oscilações axiais ("excitação por injeção"). Esta abordagem minimiza as perturbações do campo quadro-logarítmico quando um eléctrodo adicional (denominado "*deflector*") é posicionado acima da fenda de injeção com a tensão de compensação a ele aplicada. Com grande importância, fornece uma ligação inequívoca entre a fase das oscilações e a razão m/z . Tal permite usar não apenas a transformada de Fourier padrão (o chamado modo de magnitude), mas também uma versão mais refinada (eFT)(4) que utiliza informações de fase, permitindo duplicar a resolução ou, alternativamente, reduzir o tempo de aquisição a metade, para a mesma resolução. Por outro lado, o aprisionamento magnético exige uma banda de excitação de detecção de iões eficiente, onde a ligação fase- m/z é muito mais difícil de recuperar, pelo que apenas a transformada de Fourier padrão está normalmente disponível para instrumentos FT-ICR comerciais. No entanto, com a resolução recente do problema da fase, o FT-ICR pode beneficiar também do modo de absorção. Adicionalmente, os sistemas de detecção dipolar comuns a todos os FT-ICR têm vindo a ser complementados por métodos de detecção quadrupolar e até multiplar, o que multiplica a resolução (ou permite diminuir o tempo de aquisição para a mesma resolução) por um factor igual ao número de dípolos de detecção usados. O FT-ICR é o único instrumento capaz de resolver amostras extremamente complexas como o crude, plasma humano, amostras ambientais, sem recurso à cromatografia e único capaz de alcançar uma resolução e exactidão de massa que permitem resolver problemas inalcançáveis por outras soluções analíticas.

O maior mérito do Orbitrap é inquestionavelmente a democratização da alta resolução, num instrumento robusto, fácil de operar e acoplar à separação cromatográfica, que lhe dá um potencial analítico sem paralelo. O Orbitrap tem a grande vantagem de poder executar “*all ion fragmentation*” (AIF) para *untargeted analysis*. Esta tecnologia está a ser usada em aplicações forenses, como no caso de medicamentos e drogas [217]–[221], explosivos [222]–[224], tintas [225],[226] e impressões digitais [227].

Capítulo 5

Procedimento Experimental

5.1 Considerações

5.2 FT-ICR

5.2.1 Materiais

5.2.2 Instrumentação e parâmetros de análise

5.2.3 Resultados e discussão

5.2.3.1 Estabilidade da assinatura química

5.2.3.2 Influência do suporte

5.2.3.3 Composição lipídica

5.2.3.4 Diferenciação de género

5.2.3.5 Detecção do explosivo TATP

5.3 Orbitrap

5.3.1 Materiais

5.3.2 Instrumentação e parâmetros de análise

5.3.3 Resultados e discussão

5.3.3.1 Análise metabolómica

5.3.3.2 Estudo da intra-variabilidade

5.3.3.3 Diferenciação de género

5.3.3.4 Diferenciação de género e idade do dador

5.3.3.5 Detecção de substâncias exógenas

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 CONSIDERAÇÕES

No presente estudo foram utilizados dois espectrómetros de massa de FTMS: FT-ICR e Orbitrap, cujos resultados serão abordados separadamente nos sub-capítulos 5.2 e 5.3.

Nas análises por FT-ICR apenas foram usados vestígios de 8 dadores constituindo este estudo um *proof-of-concept* segundo o International Fingerprint Research Group (IFRG) [228]. Nas análises realizadas no Orbitrap foram utilizados vestígios de impressões digitais de 99 dadores, o que constitui, segundo o IFRG, uma fase mais avançada. Foi, assim, assegurada uma quantidade suficiente de amostras para obter dados estatísticos válidos. De qualquer forma, devido à variabilidade característica deste tipo de vestígios, em estudos posteriores será necessário alargar ainda mais a população de estudo, combinando os dados obtidos em ambos os espectrómetros de massa para uma caracterização ainda mais detalhada das impressões digitais.

Em estudos anteriores foram utilizados vários métodos para enriquecer a composição química do vestígio da impressão digital, porém foram poucos aqueles que usaram vestígios de impressões digitais naturais (com a combinação de secreções écrinas e sebáceas) [229].

No presente estudo apenas foram analisadas impressões digitais naturais, por representarem a maior diversidade possível de cenários em termos de condições de composição química dos vestígios, em que as impressões digitais podem ser recolhidas.

Já foi demonstrado que o mesmo dador não produz a mesma pressão na impressão digital de forma reprodutível [230]. De forma a ser conseguida uma aproximação realista, a deposição das amostras nas superfícies de estudo foi efetuada segundo as indicações aceites em termos globais para a recolha de uma resenha, e realizada de acordo com o *workflow* implementado no Setor de Lofoscopia do LPC-PJ.

A identificação e dados respeitantes aos dadores de vestígios de impressões digitais foram classificados como informação confidencial pelo Setor de Físico-Química do LPC-PJ, salvaguardando a informação pessoal e com o consentimento informado dos dadores.

5.2 FT-ICR

Neste sub-capítulo serão abordadas as análises efectuadas por espectrometria de massa FT-ICR. Descrevem-se em primeiro lugar os materiais e instrumentação utilizados, bem como os parâmetros de análise. A quimiometria é abordada de forma sucinta e objectiva. Os resultados e a sua discussão serão abordados no seguimento do presente sub-capítulo.

5.2.1 Materiais

Foram usados os seguintes materiais: água (Milli-Q), metanol, acetonitrilo e ácido fórmico (LC-MS grade), lâminas de vidro e papel de alumínio.

As amostras de explosivos de TATP foram sintetizadas na Unidade de Inactivação de Explosivos da Unidade Especial de Polícia da PSP, com recurso a três ácidos de características diferentes. Na síntese 1 de TATP foram utilizados ácido clorídrico (p.a.), acetona (p.a) e água oxigenada 35%, respetivamente das marcas Panreac, Sigma Aldrich e Scharlav. Na síntese 2 foram utilizados ácido muriático 33% da marca Lacrilar, acetona (p.a.) e peróxido de hidrogénio 35%, ambos da marca Chsquímica. Na síntese 3 foram utilizados ácido sulfúrico (p.a.) e acetona (p.a), ambos da marca Sigma Aldrich e água oxigenada 35% da marca Scharlav. Todos os reagentes foram adquiridos em estabelecimento comercial sob a forma de venda livre. Estas sínteses foram realizadas por elementos experientes da Unidade de Inactivação de explosivos da PSP.

Além destes compostos foi analisado ainda um outro proveniente de um laboratório clandestino e encontrado no âmbito de uma investigação criminal da Polícia Judiciária. O suspeito que sintetizou o composto confessou ser TATP, tendo na sua síntese – a qual será denominada por síntese 4 - utilizado acetona, água oxigenada e ácido clorídrico. Estes reagentes foram também encontrados aquando da apreensão do TATP. De acordo com as declarações do suspeito, o procedimento de síntese utilizado foi retirado da internet.

Obteve-se uma impressão digital de controlo pressionando o dedo indicador numa superfície não porosa (folha de alumínio). Dois vestígios adicionais de impressões digitais foram obtidos depois do manuseamento com TATP das sínteses 2 e 4. Todas estas impressões digitais foram analisadas logo após a sua deposição na folha de alumínio.

As imagens dos cristais de TATP em estudo foram visualizadas numa lupa estereoscópica Leica MZ125 e obtidas usando uma câmara Leica DC200.

5.2.2 Instrumentação e Parâmetros de análise

As análises por espectrometria de massa foram realizadas num equipamento FT-ICR-MS Apex Qe da marca Bruker Daltonics com uma fonte de ionização de electrospray (ESI) e um magnete de 7 Tesla.

Foram analisadas amostras de oito indivíduos como grupo de estudo, quatro do género feminino e quatro do género masculino, com idades compreendidas entre os 28 e 53 anos e de etnia caucasiana (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 Identificação dos vestígios dermopapilares constituintes deste grupo de estudo.

Nº	Idade	Género	Cosméticos	Saúde
1	39	F	✓	x
2	53	M	x	x
3	42	F	x	x
4	48	F	x	Alergias
5	28	M	x	x
6	42	F	✓	Bronquite asmática, rinite alérgica
7	52	M	x	x
8	38	M	x	Alergias

As impressões digitais foram apostas em dois tipos de suporte: lâminas de vidro e papel de alumínio. Estas impressões foram depositadas diretamente nos suportes sem qualquer tratamento e analisadas no próprio dia. A extração dos vestígios da superfície do suporte foi efetuada com 20 µl de uma solução de água/ metanol/ acetonitrilo e 1 µl de ácido fórmico. O vestígio da impressão digital foi adicionado a uma solução de 250 µl da solução de electrospray (metanol/água e 1 µl de ácido fórmico), a qual foi injetada na fonte de *electrospray*. Os espectros foram calibrados com os iões das séries b e y do péptido LHRH (*luteinizing hormone releasing hormone*) obtidos por CID do mesmo. Trata-se de uma hormona peptídica de sequência Tyr-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly e fórmula molecular C₅₅H₇₅N₁₇O₁₃.

Os espectros de massa com valores de m/z compreendidos entre 100 e 2.000 foram adquiridos no modo de ionização positivo com um fluxo de 120 µl/h. Foram acumulados 250 transientes para cada amostra, com um tamanho de aquisição de 512k. As listas de valores de m/z foram obtidas através do software Data Analysis 4.0, Bruker e submetidas ao portal *Masstrix* (<http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/>) e pesquisadas na Human Metabolome Database, Lipid maps e KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) com um desvio máximo de 2 ppm para a identificação de possíveis metabolitos e outros compostos químicos que se encontram nestas bases de dados. A seleção destes metabolitos foi efetuada de forma

manual tendo em conta a exactidão de massa e a distribuição isotópica observada nos espectros de massa.

As fórmulas de composição elementar de todos os picos seleccionados nos espectros de massa obtidos foram calculadas através de um algoritmo, denominado *Smart Formula*, incluído no software *Data Analysis* versão 4.0 da Bruker, que calcula todas as composições elementares possíveis para um determinado valor de m/z de acordo com as massas isotópicas e abundâncias, dentro de um determinado desvio. Estas fórmulas foram usadas para construir um Diagrama de Van Krevelen onde se relacionam as razões H/C e O/C, de forma a destacar as diferentes famílias de compostos [232].

A análise estatística foi realizada com o software *Profile Analysis* versão 2.2 da Bruker com recurso à análise de componentes principais (PCA), análise de *clustering* e PLS (*Partial Least Square*). O pré-processamento dos dados antes da aplicação destes métodos estatísticos consistiu na normalização através do somatório dos *bucket values* em análise e na aplicação do algoritmo de *scaling* Pareto (usa a raiz quadrada do desvio padrão como factor de *scaling*).

5.2.3 Resultados e discussão

5.2.3.1 Estabilidade da assinatura química

De forma a verificarmos a resiliência dos perfis espectrais obtidos por FT-ICR-MS com fonte de ionização por electrospray efetuámos recolhas de impressões digitais de dois dadores do grupo de estudo em t_0 , $t_0 + 1$ mês e $t_0 + 4$ meses. Todas as análises foram efetuadas no dia em que as impressões digitais foram apostas no suporte.

A obtenção de espectros de vestígios de impressões dermopapilares destes dois indivíduos (V1 e V2) em diferentes momentos de aposição diretamente em lâminas de vidro originou espectros de massa com diferentes perfis para o mesmo individuo e entre estes indivíduos, como observado na Figura 5.1. Este resultado já era espectável, uma vez que a composição de material endógeno que cada indivíduo produz está sempre a variar [81],[231].

Os vestígios destas impressões digitais foram apostos nos suportes sem qualquer limpeza prévia das mãos, pelo que estes perfis espectrais mostram não só as substâncias endógenas intrínsecas a cada um dos indivíduos, mas também eventuais substâncias exógenas. Foram também efetuadas outras experiências com as mãos lavadas com água da torneira, imediatamente antes à deposição da impressão digital no suporte, das quais resultaram os espectros das Figuras 5.2 e 5.3.

5 Procedimento Experimental

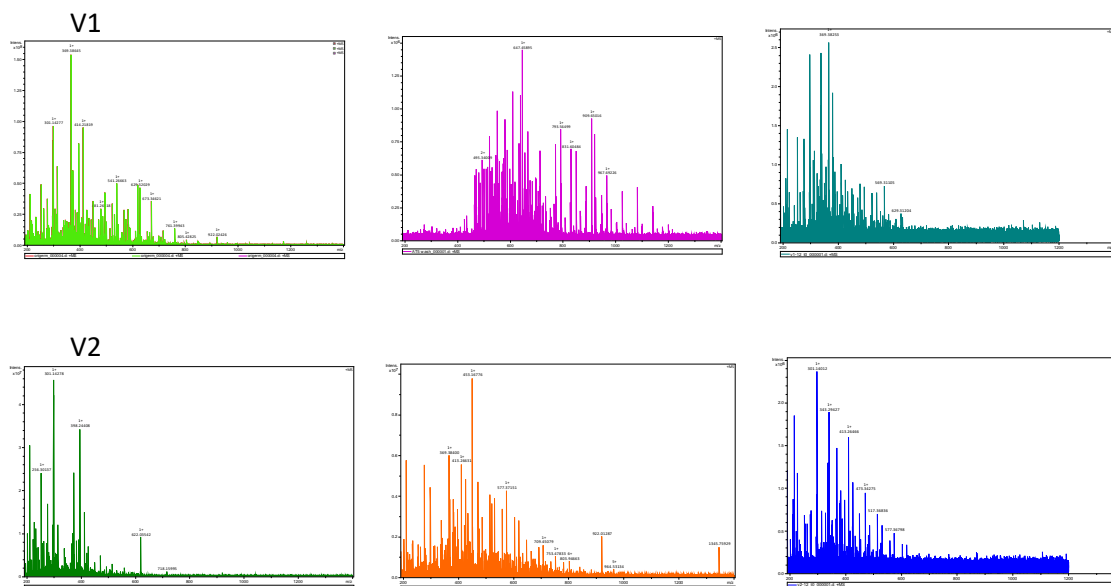


Figura 5.1 Espectros de massa dos vestígios V1 (linha superior) e V2 (linha inferior) obtidos t_0 , $t_0 + 1$ mês e $t_0 + 4$ meses, respectivamente.

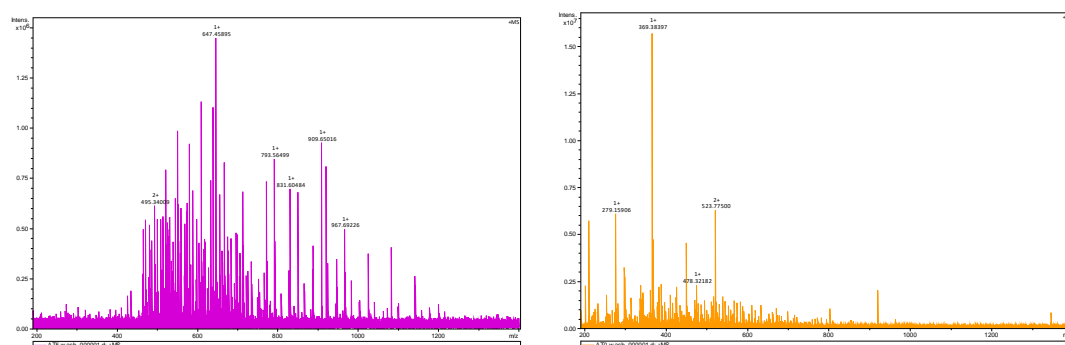


Figura 5.2 Espectros de massa dos vestígios de impressões digitais do dador V1 com as mãos sem qualquer preparação e com as mãos lavadas.

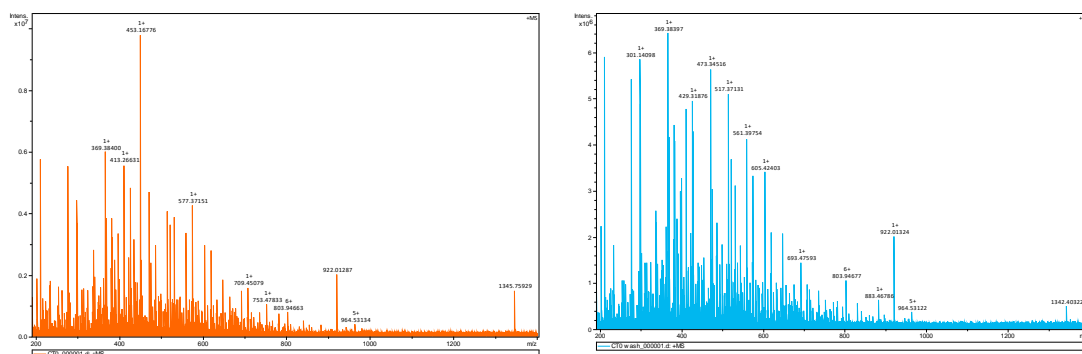


Figura 5.3 Espectros de massa dos vestígios de impressões digitais do dador V2 com as mãos sem qualquer preparação e com as mãos lavadas.

Podemos observar uma alteração significativa dos espectros de massa após a lavagem das mãos. Enquanto que no vestígio do dador V1 há uma notória diminuição das espécies químicas após a lavagem das mãos, no vestígio do dador V2 acontece precisamente o contrário. A diminuição das espécies químicas está relacionada com o desaparecimento de todas ou quase todas as espécies solúveis em água. Porém, também se deteta o aparecimento de outras espécies, provavelmente porque a remoção do material solúvel em água também diminui a supressão do sinal. Estes resultados são perfeitamente aceitáveis, pois apesar destas experiências terem sido efetuadas em continuidade, não deixam de o ser em momentos diferentes. Por outro lado, a ação de lavar as mãos foi efetuada como simulação de um hábito “normal”, ou seja, não foram evitados contactos como por exemplo o tocar na torneira, o que poderá resultar num contacto com substâncias exógenas.

5.2.3.2 Influência do suporte

Numa primeira abordagem e ainda em condições laboratoriais, para estudar a influência do suporte de aposição do vestígio foram recolhidas impressões digitais de todos os elementos do grupo de dadores (V1 a V8) em lâminas de vidro e em papel de alumínio. Estas experiências foram realizadas em continuidade e as análises foram efetuadas no dia da recolha.

Estes dois suportes (lâminas de vidro e papel de alumínio) são não-porosos, pelo que de acordo com os estudos efetuados por vários autores [28-30], substratos com estas características permitem analisar todos os compostos existentes na impressão digital, quer sejam eles de origem écrina ou sebácea. Estes componentes permanecem na superfície do substrato até ao início do processo de degradação física, química ou biológica.

A maior parte dos vestígios apresenta um espectro de massa com diferenças significativas entre si, havendo apenas maior semelhança nos perfis dos vestígios V2, V3 e V7. Há que realçar que alguns dadores utilizaram o mesmo dedo na aposição do vestígio em ambos os suportes e outros utilizaram diferentes dedos. A análise dos resultados através de PCA não permitiu tirar conclusões em termos de diferenciação do substrato (papel de alumínio vs vidro) pelo que ambos podem ser usados para o mesmo fim.

5.2.3.3 Composição lipídica

A obtenção dos espectros dos vestígios de impressões dermopapilares dos indivíduos em estudo, em diferentes momentos de aposição diretamente em lâminas de vidro e/ou papel de alumínio, originou espectros de massa com diferentes perfis para o mesmo indivíduo e entre indivíduos. Este resultado já era espectável, uma vez que a composição de material endógeno que cada indivíduo produz está sempre a variar e a capacidade de secreção de suor também varia de pessoa para pessoa. Os vestígios destas impressões digitais foram apostos nos suportes sem qualquer limpeza prévia das mãos, pelo que os perfis espectrais mostram não apenas as substâncias endógenas intrínsecas a cada um dos indivíduos, mas também eventuais substâncias exógenas.

Os lípidos, proteínas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos representam os quatro maiores grupos de moléculas existentes nos sistemas vivos, nos quais ocorrem em diferentes proporções. Observa-se que nos vestígios analisados os lípidos representam o conjunto maioritário ($O:C \leq 0.6$ e $H:C \geq 1.32$), ver a título exemplificativo o correspondente Diagrama de Van Krevelen na Figura 5.4 [232].

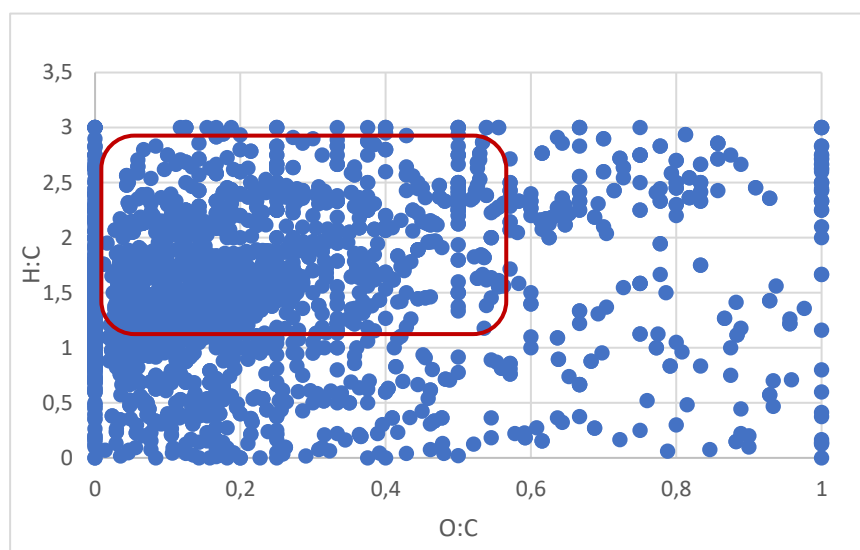


Figura 5.4 Diagrama de Van Krevelen dos elementos obtidos de uma das análises aos vestígios dermopapilares do dador 1. O rectângulo a vermelho representa aproximadamente o conjunto de espécies que podem ser atribuídos a lípidos.

Os lípidos são moléculas orgânicas que constituem os alicerces estruturais das biomembranas e consequentemente, das células vivas, sendo deste modo indispensáveis para todos os seres vivos. Estes desempenham um papel fundamental como reserva energética, além das funções

vitamínica e de proteção. Os lípidos de natureza endógena são segregados pelas glândulas sebáceas. Estudos anteriores comprovaram a sua presença em vestígios dermopapilares [10],[92],[97],[120],[143]. Hart P. e seus colaboradores [97] estudaram os lípidos da pele humana por MALDI-ToF com sistema de imagiologia e identificaram cerca de 20 lípidos respeitantes a 5 classes diferentes. As espécies constituintes da epiderme mostraram maior intensidade de sinal no intervalo de m/z entre os 700 e os 910. Estes componentes foram identificados nas classes SM (esfingomielina) e PC (fosfatidilcolina). Na derme verificou-se maior intensidade de sinal em valores de m/z abaixo de 700.

A consulta das bases de dados através do portal *MASSTRIX* (<http://masstrix3.helmholtz-muenchen.de/masstrix3/>) usando as bases de dados HMDB, Keeg e *Lipids Maps* (<http://www.lipidmaps.org/>) permitiu a identificação putativa de sete classes destes compostos. Foram detetados 140 lípidos, correspondentes a 11 sub-classes de FA, 6 sub-classes PR, 17 sub-classes ST, 12 sub-classes PK, 19 sub-classes GP, 2 sub-classes SP e 1 Sub-classe GL, perfazendo um total de 68 sub-classes.

Os ácidos gordos são uma das classes de lípidos, tendo sido detetadas 11 sub-classes (destes compostos: FA04, FA05, FA06, FA0103, FA0105, FA0106, FA0109, FA0201, FA0301, FA0312 e FA0802. A Tabela 5.2 contém 21 espécies químicas identificadas neste categoria. Destacam-se as espécies para as quais foi possível alcançar uma identificação individual. O ião $[C_{11}H_{16}O_5+Na]^+$ (m/z 229,17941, desvio de 0,38 ppm) atribuído à subclasse álcoois gordos [FA05] corresponde ao composto 2R,9R-di-hidroxi-3S,4S,7S,8S-diepoxi-5E, 10-undecadien-1-ol. Também neste subgrupo foi possível identificar o ião $[C_{14}H_{30}O_2+Na]^+$ (m/z 253,21360, desvio -0,47 ppm) que corresponde ao lípido 2,2,9,9-tetrametil-undecano-1,10-diol. O ácido gordo hidroxi [FA0105] m/z 277,10422 corresponde ao aduto de sódio da espécie 4-[2-(2-formil-vinil)-3-hidroxi-5-oxo-ciclopentil]-butanoato de metilo. Apenas foi encontrado um lípido pertencente à subclasse de ácidos gordos halogenados [FA0109]. O ião $[C_{10}H_{19}BrO_2+K]^+$ (m/z 289,01991, desvio -0,18 ppm) corresponde ao composto do ácido bromo-decanóico, não sendo possível distinguir entre os isómeros ácido 10-bromo-decanóico, ácido 2-bromo-decanóico e ácido 9-bromo-decanóico. Foram identificadas duas prostaglandinas nos vestígios dermopapilares analisados. O ião $[C_{16}H_{28}O_5+K]^+$ (m/z 339,15661, desvio -0,65 ppm) corresponde ao aduto de potássio da prostaglandina 2,3,4,5-tetranor-9S, 11R, 15S-trihidroxi-13E-prostenóico, comumente conhecida como tetranor-PGF1 α (Figura 5.5), e o ião $[C_{23}H_{30}O_5+Na]^+$ (m/z 409,19846, desvio -0,20 ppm) corresponde ao aduto de sódio do 17-

fenil-trinor-PGE2. Estes compostos aparecem em 5 dos vestígios analisados de 2 dadores (feminino e masculino).

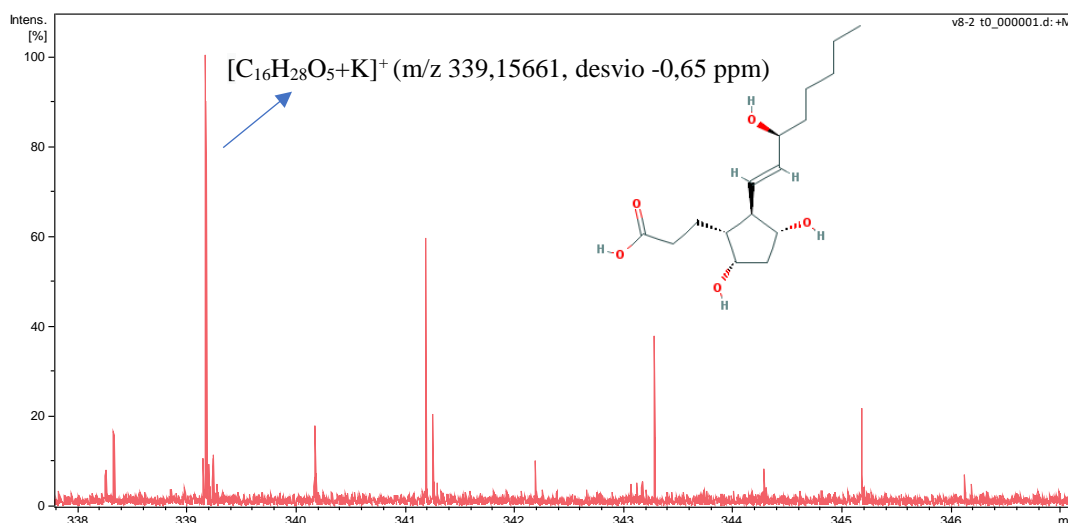


Figura 5.5 Espectro de massa de um dos vestígios, onde é identificável a prostaglandina tetranor-PGF1α.

As prostaglandinas pertencem à classe principal dos eicosanóides, metabolitos de ácidos gordos C20 biologicamente ativos, incluindo prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, agindo como hormonas de vida curta ou mediadores [209]. As famílias das prostaglandinas PG1, PG2 e PG3 são derivadas do ácido dihomo-linolénico (20:3 n-6), ácido araquidónico (20:4 n-6) e ácido eicosapentanóico (EPA, 20:5 n-3), respetivamente, através dos seus endoperóxidos cíclicos. Entre outras funções, as prostaglandinas estão envolvidas na resposta inflamatória, agregação plaquetária, vasodilatação e função do músculo liso [210]. Estes lípidos são formados quando o ácido araquidónico (ácido gordo insaturado (C20:4)) é libertado da membrana plasmática pelas fosfolipases e metabolizado pelas ações sequenciais da síntese da prostaglandina G/H ou, pela ação da enzima ciclooxygenase. Os ácidos gordos insaturados promovem o aumento da produção do vasodilatador prostaglandina PGF1. A PGE2, a segunda prostaglandina detetada, é um mediador lipídico de grande relevância bioquímica que atua num conjunto de recetores acoplados à proteína G denominados EP. Esta prostaglandina é pró-inflamatória, aumenta a permeabilidade vascular e a infiltração de leucócitos [211].

O ião $[C_{28}H_{41}O_2]^+$ (m/z 409.31016, desvio 0,12 ppm), correspondente a $[M+H]^+$ pertence à subclasse de ácidos gordos insaturados [FA0103]. Também foram identificadas 3 N-acil-aminas [FA0802]: ácido oleoil glutâmico (ácido N-(9Z-octadecenoil)-glutâmico), (+/-) N-(2-fluoroetil)-2,16,16-trimetil-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-tricosatetraenoilamina e N-palmitoil triptofano (N-hexadecanoil-triptofano). Os lipoaminoácidos simples denominados acilaminoácidos,

5 Procedimento Experimental

contêm um ácido gordo e um aminoácido ligados por uma ligação amida. O ião $[C_{24}H_{41}N_3O_3+K]^+$ corresponde ao aduto de potássio do composto *N*-oleoil-histidina. 50% dos lípidos da classe FA foram detetados numa das dadoras do género feminino. Todos os outros, exceto os vestígios do dador nº 2, contêm esse tipo de lípidos.

Tabela 5.2 Ácidos gordos (FA) identificados nos vestígios de impressões digitais analisados.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe
Experimental	Teórico			
195,09906	195,09916	-0,53	$[C_9H_{16}O_3+Na]^+$	Oxo ácidos gordos [FA0106]
201,14813	201,14852	1,94	$[C_{11}H_{21}O_3]^+$	Ácidos gordos hidroxi [FA0105]
229,17941	229,17982	-1,79	$[C_{13}H_{25}O_3]^+$	Oxo ácidos gordos [FA0106]
251,08909	251,08899	0,38	$[C_{11}H_{16}O_5+Na]^+$	Álcoois gordos [FA05]
253,21368	253,21380	-0,47	$[C_{14}H_{30}O_2+Na]^+$	Álcoois gordos [FA05]
277,10422	277,10464	-1,53	$[C_{13}H_{18}O_5+Na]^+$	Ácidos gordos hidroxi [FA0105]
289,01991	289,01996	-0,18	$[C_{10}H_{19}BrO_2+K]^+$	Ácidos gordos halogenados [FA0109]
297,16137	297,16158	-0,72	$[C_{17}H_{26}ClO_2]^+$	Álcoois gordos [FA05]
307,16648	307,16700	-1,70	$[C_{16}H_{28}O_3]^+$	Metabolitos do ácido 12-oxofitodienóico [FA0201]
339,15661	339,15683	-0,65	$[C_{16}H_{28}O_5+K]^+$	Prostaglandinas [FA0301]
367,22461	367,22436	0,66	$[C_{22}H_{32}O_3+Na]^+$	Docosanóides [FA04]
409,19846	409,19854	-0,20	$[C_{23}H_{30}O_5+Na]^+$	Prostaglandinas [FA0301]
409,31016	409,31010	0,12	$[C_{28}H_{41}O_2]^+$	Ácidos gordos insaturados [FA0103]
419,21860	419,21943	-1,98	$[C_{22}H_{36}O_5+K]^+$	Prostaglandinas [FA0301]
447,23792	447,23772	0,42	$[C_{25}H_{35}O_7]^+$	Clavulonas e derivados [FA0312]
450,26101	450,26163	-1,38	$[C_{23}H_{41}NO_5+K]^+$	N-acil aminas [FA0802]
456,36186	456,36121	1,41	$[C_{28}H_{48}FNO+Na]^+$	N-acil aminas [FA0802]
458,27812	458,27795	0,36	$[C_{24}H_{41}N_3O_3+K]^+$	N-acil aminas [FA0802]
481,28235	481,28270	-0,73	$[C_{27}H_{42}N_2O_3+K]^+$	N-acil aminas [FA0802]
519,17600	519,17561	0,73	$[C_{25}H_{33}ClO_8+Na]^+$	Clavulonas e derivados [FA0312]
563,20179	563,20183	-0,07	$[C_{27}H_{37}ClO_9+Na]^+$	Clavulonas e derivados [FA0312]

Em relação aos lípidos da classe prenol, foram observadas 6 subclasses: PR103, PR0104, PR0105, PR0107, PR0109 e PR0309. Nesta classe de lípidos, foram detetadas 16 espécies, principalmente isoprenóides (Tabela 5.3).

Os isoprenóides correspondem funcional e estruturalmente ao grupo mais diversificado de metabolitos, com pelo menos 50.000 moléculas diferentes identificadas, a maioria encontrada no reino vegetal. Podem atuar como metabolitos primários com funções na fotossíntese, respiração, fluidez da membrana e regulação do crescimento e desenvolvimento, e como metabolitos secundários com substancial valor comercial, farmacológico e agrícola, como óleos essenciais, substâncias psicoativas, polímeros da borracha, aromas, corantes e agroquímicos. Também participam em interações alelopáticas e planta-patogénicas [233].

Tabela 5.3 Prenóis (PR) identificados nos vestígios de impressões digitais analisados.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe
Experimental	Teórico			
235,16883	235,16925	-1,81	$[C_{15}H_{23}O_2]^+$	Isoprenoides C15 (sesquiterpenos) [PR0103]
243,15101	243,15096	0,20	$[C_{15}H_{24}+K]^+$	Isoprenoides C15 (sesquiterpenos) [PR0103]
249,14803	249,14852	-1,97	$[C_{15}H_{21}O_3]^+$	Isoprenoides C15 (sesquiterpenos) [PR0103]
385,34423	385,34408	0,37	$[C_{25}H_{46}O+Na]^+$	Isoprenoides C25 (sesterterpenos) [PR0105]
481,22063	481,21967	1,98	$[C_{26}H_{34}O_7+Na]^+$	Isoprenoides C15 (sesquiterpenos) [PR0103]
481,25889	481,25846	0,88	$[C_{29}H_{37}O_6]^+$	Isoprenoides C20 (diterpenos) [PR0104]
521,27922	521,27915	0,12	$[C_{25}H_{47}O_7P_2]^+$	Difosfatos de dolicol [PR0309]
581,44805	581,44831	-0,44	$[C_{40}H_{62}+K]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
589,43803	589,43814	-0,18	$[C_{38}H_{62}O_2+K]^+$	Retinoides [PR0109]
595,37902	595,37818	1,39	$[C_{40}H_{51}O_4]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
631,36288	631,36293	0,07	$[C_{39}H_{51}O_7]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
633,33462	633,33406	0,86	$[C_{40}H_{50}O_4+K]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
637,43920	637,43814	1,66	$[C_{42}H_{62}O_2+K]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
639,40222	639,40199	0,35	$[C_{40}H_{56}O_5+Na]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]
683,40001	683,40010	-0,13	$[C_{36}H_{59}O_{12}]^+$	Isoprenoides C20 (diterpenos) [PR0104]
751,49052	751,49081	-0,38	$[C_{47}H_{68}O_6+Na]^+$	Isoprenoides C40 (tetraterpenos) [PR0107]

A espécie química $[C_{25}H_{47}O_7P_2]^+$, correspondente a $[M+H]^+$ (m/z 521,27922, desvio 0,12 ppm), pode ser atribuída ao lípido difosfato de dolículo. Durante o envelhecimento, o cérebro humano mostra um aumento progressivo nos níveis de dolículo. Sabe-se que a glicosilação de resíduos de asparagina nas proteínas ocorre por transferência a partir de um oligossacarídeo difosfato de dolículo contendo glicose. A adição de todas as glicoses ao oligossacarídeo difosfato de dolículo ocorre com a glicose de dilicil difosfato como dador [234]. Este lípido foi detetado apenas num dos vestígios de uma dadora. O tetraterpeno *all-trans*-fitoflueno (7,8,11,12,7',8'-hexa-hidro- ψ,ψ -caroteno) foi detetado como aduto de potássio a m/z 581,48805 com um desvio de -0,44 ppm. Os carotenóides são moléculas isoprenóides que geralmente são encontradas como pigmentos em frutas, flores, pássaros e crustáceos. Os animais não podem sintetizar carotenóides e dependem da dieta como fonte destes compostos. Nos últimos anos, houve um interesse considerável nos carotenóides alimentares, devido ao seu potencial de ação em doenças relacionadas com a idade em humanos. Este interesse refletiu-se em avanços significativos na clonagem da maioria dos genes que codificam enzimas do metabolismo dos carotenóides e na manipulação genética de plantas cultivadas com a intenção de aumentar os níveis destes compostos na alimentação. Diversos estudos demonstraram uma relação inversa entre o consumo de certas frutas e vegetais e o risco de cancro epitelial. Como os carotenóides estão entre os micronutrientes encontrados nos alimentos preventivos do cancro, a

determinação qualitativa e quantitativa detalhada destes compostos, particularmente em frutas, vegetais e plasma humano, tornou-se cada vez mais importante. O consumo de carotenóides na dieta de frutas e legumes leva a acúmulos na pele humana [235][236]. Outro caroteno identificado foi a anidrorrodovibrina, cujo aduto de sódio $[C_{21}H_{58}O+Na]^+$ aparece no espectro a m/z 589,43803, com um desvio de 0,07 ppm.

Da subclasse dos retinoides PR0109, apenas foi identificado o ião aduto de potássio do oleato de *all-trans*-retinil $[C_{38}H_{62}O_2+K]^+$ (m/z 589,43803, desvio -0,18 ppm) num dos vestígios do dador nº 1. Na pele, o maior órgão do corpo, a proliferação, diferenciação e desenvolvimento da barreira da permeabilidade epidérmica dependem muito dos retinoides [237]. Os seres humanos não conseguem sintetizar a vitamina A. Os retinoides são retirados das plantas como pró-vitamina β -caroteno, mas também do tecido animal como ésteres de retinil. Estes são produzidos para armazenar o excesso de retinoides. São armazenados principalmente no fígado, mas também (em menor quantidade) no tecido adiposo. Os retinoides são necessários para um grande número de processos biológicos, como a embriogénese, a reprodução, a inflamação, a diferenciação, a proliferação, a visão, o crescimento e a apoptose. Os retinoides naturais, bem como os seus precursores carotenóides, são marcados pela presença de uma unidade de polieno conjugado de cadeia longa. Por este motivo, as moléculas são sensíveis à oxidação e à isomeria, e podem ser afetadas principalmente por ácido, luz ou calor. Devido à presença da unidade de poliolefina, as reações de formação de olefinas aparecem nas sínteses dos retinoides. Classicamente, a reação de Wittig tem sido extensivamente usada nas sínteses de retinoides e carotenóides [238][239].

O ião $[C_{39}H_{51}O_7]^+$ (m/z 631.36288, desvio 0,07 ppm) corresponde à peridinina, que é um carotenóide que “busca” a luz, um pigmento associado à clorofila, que forma o complexo coletor de luz da proteína peridinina-clorofila em dinoflagelados. Esta espécie foi detetada apenas nos dois vestígios do indivíduo nº 6. Nesta subclasse (PR0107) foi possível identificar os carotenoides hidroxialoxantina e 3,4-di-hidro-espiriloxantina. A molécula protonada $[C_{36}H_{58}O_{12}+H]^+$ (m/z 683,70001, desvio -0,13 ppm) foi identificada como Fusicoccina A. Este diterpeno é um glicósido produzido por um fungo patogénico [240].

Os glicerofosfolípidos são lípidos de membrana, nos quais dois ácidos gordos são ligados numa ligação éster ao primeiro e segundo carbonos do glicerol, e um grupo altamente polar ou carregado é ligado por uma ligação fosfodiéster ao terceiro carbono. O glicerol é proquiral; não possui carbonos assimétricos, mas a ligação do fosfato a uma extremidade converte-o num composto quiral, designado por L-glicerol 3-fosfato, D-glicerol 3-fosfato ou sn-glicerol 3-

fosfato. Nos vestígios de impressões digitais analisados, foram detetados 42 glicerofosfolípidos, os quais foram divididos em 19 subclasses: GP0101, GP0105, GP0305, GP0301, GP0305, GP0305, GP0401, GP0403, GP0405, GP0602, GP0603, GP0605, GP0605, GP0605, GP0605, GP0605, GP1006 e GP1007 (Tabela 5.4). O íão a m/z 417,381 foi identificado como o aduto de sódio do 1-(1Z-hexadecenil)-n-glicero-3-fosfato (PA (P-16:0/0:0)), um intermediário do metabolismo lipídico do correspondente éter. Ao contrário da ligação éster usual, os lípidos éter são lípidos nos quais um ou mais átomos de carbono de glicerol estão ligados a uma cadeia alquila por meio de uma ligação éter. O 1-(1Z-hexadecenil)-sn-glicero-3-fosfato é produzido irreversivelmente a partir de 1-(1Z-hexadecenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina através da enzima alquilglicerofosfoetanolamina fosfodiesterase [241].

Foram identificados os seguintes glicerofosfolípidos:

- **GP1006:** PA(O-16:0/0:0); 1-hexadecil-glicero-3-fosfato (m/z 419,25401)
- **GP1005:** PA(18:2(9Z,12Z)/0:0); 1-(9Z,12Z-octadecadienoil)-glicero-3-fosfato (m/z 435,25090), PA(18:0/0:0); 1-octadecanoil-sn-glicero-3-fosfato (m/z 461,26442), PA(20:0/0:0); 1-eicosanoil-glicero-3-fosfato (m/z 489,29606), PA(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0); 1-(7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoil)-glicero-3-fosfato (m/z 525,23786), PA(22:1(11Z)/0:0); 1-(11Z-docosenoil)-glicero-3-fosfato (m/z 531,28574)
- **GP0401:** PG(6:0/6:0); 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z 443,20392), PG(13:0/12:0); 1-tridecanoil-2-dodecanoil-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z 663,36332)
- **GP0101:** PC(6:0/6:0); 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (m/z 454,25607), PC(6:0/6:0); 1,2-dihexanoil-sn-glicero-3-fosfocolina (m/z 476,23883), PA(12:0/12:0); 1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfato (m/z 575,31188)
- **GP1007:** PA(P-20:0/0:0); 1-(1Z-eicosenil)-glicero-3-fosfato (m/z 473,30073)
- **GP0305:** PS(16:0/0:0); 1-hexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoserina (m/z 498,28180), PS(18:1(9Z)/0:0); 1-(9Z-octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoserina (m/z 546,28000)
- **GP0301:** PS(8:0/8:0); 1,2-dioctanoil-sn-glicero-3-fosfoserina (m/z 512,26113), PS(10:0/10:0); 1,2-didecanoil-sn-glicero-3-fosfoserina (m/z 590,30597), PS(12:0/12:0); 1,2-didodecanoil-sn-glicero-3-fosfoserina (m/z GP0301)
- **GP0405:** PG(17:1(9Z)/0:0); 1-(9Z-heptadecenoil)-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z 519,26838), PG(19:0/0:0); 1-nonadecanoil-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z

549,31551), PG(20:1(11Z)/0:0); 1-(11Z-eicosenoil)-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z 561,31662)

- **GP0205:** PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0); 1-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoil)-glicero-3-fosfoetanolamina (m/z 526,28997), PE(20:3(8Z,11Z,14Z)/0:0); 1-(8Z,11Z,14Z-eicosatrienoil)-glicero-3-fosfoetanolamina (m/z 542,26341)
- **GP1002:** PA(O-16:0/14:0); 1-hexadecil-2-tetradecanoil-glicero-3-fosfato (m/z 629,45053)
- **GP0403:** PG(P-16:0/14:1(9Z)); 1-(1Z-hexadecenil)-2-(9Z-tetradecenoil)-glicero-3-fosfo-(1'-sn-glicerol) (m/z 677,47649)
- **GP0605:** PI(22:0/0:0); 1-docosanoil-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (m/z 695,35318)
- **GP0603:** PI(P-20:0/17:2(9Z,12Z)); 1-(1Z-eicosenil)-2-(9Z,12Z-heptadecadienoil)-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) (m/z 899,54125)

Os 1-acilglicerol-3-fosfato e 1-hexadecil-glicero-3-fosfato podem ter origem endógena ou exógena, pois são usados como aditivos ou suplementos alimentares, e também como surfactantes ou emulsificantes com uso industrial (Figuras 5.6 e 5.7).

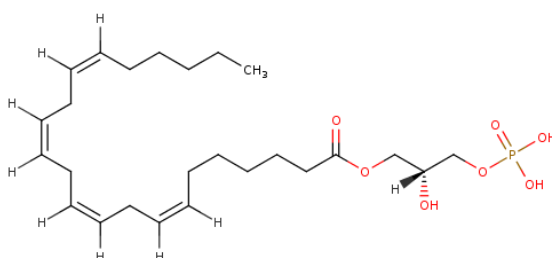


Figura 5.6 Estrutura molecular do 1-(7Z,10Z,13Z,16Z-docosatetraenoil)-glicero-3-fosfato (ião a m/z 525,23786).

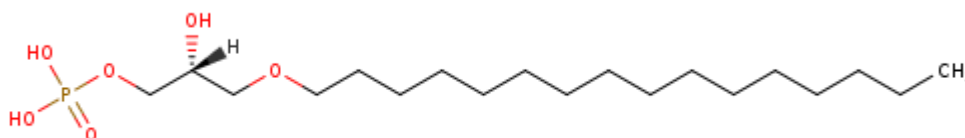


Figura 5.7 Estrutura molecular do 1-hexadecil-glicero-3-fosfato (ião a m/z 419,25401).

O inositol é um poliol derivado do ciclo-hexano com seis grupos hidroxilo. Também conhecido como álcool do açúcar, possui a mesma fórmula molecular que a glicose ou outras hexoses. O inositol existe em nove possíveis estereoisômeros, incluindo cilo-inositol, mio-inositol (o mais

5 Procedimento Experimental

frequente), muco-inositol, D-quiro-inositol, L-quiro-inositol, neo-inositol, alo-inositol, epi-inositol e cis-inositol. Neste estudo, foram identificados dois compostos de mio-inositol: 1-docosanoil-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol) e 1-(1Z-eicosenil)-2-(9Z,12Z-heptadecadienoil) glicerol-3-fosfo-(1'-mio-inositol).

Tabela 5.4 Glicerofosfolípidos detetados nos vestígios de impressões digitais analisados.

massa (Da)		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe
Experimental	Teórico			
378,16449	378,16520	-1,90	$[C_{14}H_{30}NO_7P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfocolinas [GP0105]]
398,23074	398,23021	1,31	$[C_{17}H_{37}NO_7P]^+$	Monoacilglicerofosfocolinas [GP0105]
417,23819	417,23764	1,30	$[C_{19}H_{39}O_6P+Na]^+$	1Z-alcenilglicerofosfatos [GP1007]
419,25401	419,25329	1,70	$[C_{19}H_{41}O_6P+Na]^+$	Monoalquilglicerofosfatos [GP1006]
420,21297	420,21215	1,92	$[C_{17}H_{36}NO_7P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfoetanolaminas [GP0205]
435,25090	435,25061	0,65	$[C_{21}H_{40}O_7P]^+$	Monoacilglicerofosfatos [GP1005]
443,20392	443,20406	-0,31	$[C_{18}H_{36}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
454,25607	454,25643	-0,79	$[C_{20}H_{40}NO_8P]^+$	Diacilglicerofosfocolinas [GP0101]
461,26442	461,26386	1,21	$[C_{21}H_{43}O_7P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfatos [GP1005]
473,30073	473,30024	1,02	$[C_{23}H_{47}O_6P+Na]^+$	1Z-alcenilglicerofosfatos [GP1007]
476,23883	476,23837	0,95	$[C_{20}H_{40}NO_8P+Na]^+$	Diacilglicerofosfocolinas [GP0101]
489,29606	489,29516	1,83	$[C_{23}H_{47}O_7P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfatos [GP1005]
498,28180	498,28264	-1,69	$[C_{22}H_{45}NO_9P]^+$	Monoacilglicerofosfocerinas [GP0305]
507,27237	507,27174	1,23	$[C_{24}H_{44}O_9P]^+$	Monoacilglicerofosfoglicerois [GP0405]
512,26113	512,26190	1,52	$[C_{22}H_{43}NO_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]
519,26838	519,26934	-1,84	$[C_{23}H_{45}O_9P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfoglicerois [GP0405]
525,23786	525,23779	0,11	$[C_{25}H_{43}O_7P+K]^+$	Monoacilglicerofosfatos [GP1005]
526,28997	526,29041	-0,83	$[C_{25}H_{46}NO_7P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfoetanolaminas [GP0205]]
531,28574	531,28474	1,86	$[C_{25}H_{49}O_7P+K]^+$	Monoacilglicerofosfatos [GP1005]]
542,26341	542,26434	-1,73	$[C_{25}H_{46}NO_7P+K]^+$	Monoacilglicerofosfoetanolaminas [GP0205]
546,28000	546,28023	-0,43	$[C_{24}H_{46}NO_9P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfocerinas [GP0305]
549,31551	549,31629	-1,42	$[C_{25}H_{51}O_9P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfoglicerois [GP0405]
561,31662	561,31629	0,58	$[C_{26}H_{51}O_9P+Na]^+$	Monoacilglicerofosfoglicerois [GP0405]
575,31188	575,31096	1,59	$[C_{27}H_{53}O_8P+K]^+$	Diacilglicerofosfatos [GP1001]
590,30597	590,30645	-0,82	$[C_{26}H_{50}NO_{10}P+Na]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]
629,45053	629,45166	1,79	$[C_{33}H_{67}O_7P+Na]^+$	1-alkuil,2-acilglicerofosfatos [GP1002]
633,45017	633,44898	1,87	$[C_{34}H_{66}O_8P]^+$	Diacilglicerofosfatos [GP1001]]
639,40222	639,40203	0,29	$[C_{35}H_{60}O_8P]^+$	Diacilglicerofosfatos [GP1001]
662,34176	662,34299	-1,86	$[C_{30}H_{58}NO_{10}P+K]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]
663,36332	663,36339	-0,11	$[C_{31}H_{61}O_{10}P+K]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
677,47649	677,47519	1,90	$[C_{36}H_{70}O_9P]^+$	1Z-alkenil,2-acilglicerofosfoglicerois [GP0403]
689,37998	689,37904	1,35	$[C_{33}H_{63}O_{10}P+K]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
693,47141	693,47011	1,87	$[C_{36}H_{70}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
695,35318	695,35322	-0,06	$[C_{31}H_{61}O_{12}P+K]^+$	Monoacilglicerofosfoinositois [GP0605]
707,48680	707,48576	1,46	$[C_{37}H_{72}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
730,40481	730,40559	-1,07	$[C_{35}H_{66}NO_{10}P+K]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]
735,51646	735,51706	-0,81	$[C_{39}H_{75}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
753,47109	753,47011	1,29	$[C_{41}H_{70}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
767,48507	767,48576	-0,90	$[C_{42}H_{72}O_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfoglicerois [GP0401]
790,40470	790,40559	-1,13	$[C_{40}H_{66}NO_{10}P+K]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]
856,51340	856,51231	1,27	$[C_{48}H_{75}NO_{10}P]^+$	Diacilglicerofosfocerinas [GP0301]]
899,54125	899,54102	0,25	$[C_{46}H_{85}O_{12}P+K]^+$	1Z-alkenil,2-acilglicerofosfoinositois [GP0603]

Foram detetados um total de 34 lípidos esteróis e agrupados em 17 sub-classes: ST0101, ST0103, ST0104, ST0108, ST0109, ST0116, ST0203, ST0301, ST0302, ST0401, ST0403, ST0404, ST0406, ST0501, ST0502, ST0503 e ST0505 (Tabela 5.5).

As hormonas esteróides derivadas do colesterol são uma classe de compostos biologicamente ativos em vertebrados. A pregnenolona e a progesterona são a origem dos três grupos de esteróides: esteróides C21 de glicocorticóides e mineralocorticóides, esteróides C19 de andrógenos e esteróides C18 de estrogénios. A progesterona é convertida em corticosterona, que é modificada por hidroxilação e oxiredução no carbono 18 para produzir a aldosterona, um mineralcorticóide. O cortisol, o principal glicocorticóide, é formado a partir de 17 α -hidroxiprogesterona com 11-desoxicortisol como intermediário. A hormona masculina testosterona é formada a partir de pregnenolona. As hormonas femininas estrona e estradiol são formadas a partir de testosterona e 4-androsteno-3,17-diona por remoção oxidativa do grupo metilo C19 e subsequente aromatização do anel A [242][243].

Os iões $[C_{21}H_{29}O_6]^+$ e adutos de sódio e potássio respetivamente $[C_{21}H_{28}O_6+Na]^+$ e $[C_{21}H_{28}O_6+K]^+$ podem ser atribuídos ao 18-oxocortisol (derivado do cortisol) [244]. Oxigenases específicas sintetizam vários oxisteróis diferentes nas células [245]. No entanto, os oxisteróis podem ser formados rapidamente por oxidação não enzimática (auto-oxidação) de colesterol e ésteres de colesterol nos tecidos, com formação de uma multiplicidade de diferentes derivados oxigenados, devido à presença da dupla ligação na posição 5,6. A microflora intestinal pode gerar moléculas de colesterol oxidado que podem ser absorvidas pela circulação entero-hepática. Uma vez que uma função de oxigénio é introduzida no colesterol celular, o produto pode atuar como mediador biologicamente ativo, interagindo com recetores específicos antes de ser metabolizado em ácidos biliares ou degradado ainda mais, processos auxiliados pelo facto dos oxisteróis serem capazes de se difundir muito mais rapidamente através das membranas do que o próprio colesterol [246].

O acetato de cortisona 17 α ,21-dihidroxipregn-4-ene-3,11,20-triona (m/z 403,21198) é uma hormona esteróide que possui atividades glicocorticóides e mineralocorticóides [244]. Os corticosteróides aliviam as inflamações. Atuam no edema, vermelhidão, prurido e reações alérgicas. São usados como parte do tratamento de uma grande quantidade de doenças, alérgicas e inflamatórias. Os glicocorticóides endógenos e alguns corticoides sintéticos têm alta afinidade com a proteína transcortina (também denominada CBG, proteína de ligação aos corticosteróides), enquanto todos eles se ligam à albumina [247].

Outros derivados do colesterol cuja identificação foi possível foram:

- dihidrogenofosfato de (22R)-3 β ,14,20,25-tetrahidroxi-6-oxo-5 β -colest-7-en-22-il (m/z 545,28667)
- colest-5,24-dien-3- β -ol-3-O- β -D-glucopiranosídeo (m/z 547,40026)
- colesteril- β -D-glucósido (m/z 549,41578).

A biossíntese destes compostos envolve glucosilceramida para transferir glicose para o colesterol catalisado por uma β -glucocerebrosidase celular, como pode ser visto na Figura 5.8, na superfície citosólica do retículo endoplasmático e do aparelho de Golgi em condições normais; a reação inversa também ocorre através da ação de uma segunda glicocerebrosidase no lado luminal das membranas lisossômicas [248].

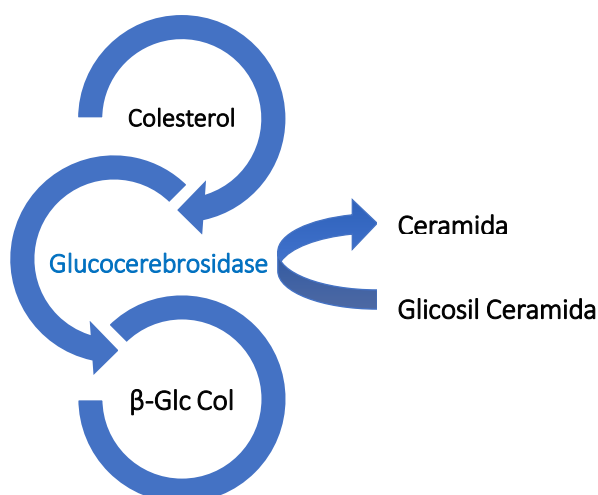


Figura 5.8 Biossíntese de alguns derivados do colesterol.

Várias metodologias analíticas, como LC-MS, já foram utilizadas para a detecção de todas as classes de esteróides (glicocorticóides, progestinas, andrógenos, estrógenos e mineralocorticóides) e ácidos biliares [249], nas quais as matrizes mais comuns para esse tipo de análise foram os fluidos biológicos. Também já foram realizados estudos para a determinação de esteróis no cabelo [250] e saliva [251]. Através de LC-MS foram detectados no cabelo esteróis endógenos, como por exemplo cortisol, cortisona, testosterona, progesterona e sulfatos de colesterol e na saliva, cortisol e cortisona.

5 Procedimento Experimental

Tabela 5.5 Lípidos esteróis (ST) detetados nos vestígios de impressões digitais analisados.

massa (Da)		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe
Experimental	Teórico			
377,19541	377,19586	-1,20	[C ₂₁ H ₂₉ O ₆] ⁺	Esteroides C21 (gluco/mineralocorticoides, progestinas) e derivados [ST0203]
385,17772	385,17756	0,39	[C ₂₁ H ₃₀ O ₄ +K] ⁺	Esteroides C21 (gluco/mineralocorticoides, progestinas) e derivados [ST0203]
391,28357	391,28428	-1,83	[C ₂₄ H ₃₉ O ₄] ⁺	Ácidos biliares C24, álcoois e derivados [ST0401]
395,22488	395,22505	-0,44	[C ₂₂ H ₃₅ O ₄ S] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
399,17742	399,17780	-0,97	[C ₂₁ H ₂₈ O ₆ +Na] ⁺	Esteroides C21 (gluco/mineralocorticoides, progestinas) e derivados [ST0203]
403,21198	403,21151	1,15	[C ₂₃ H ₃₁ O ₆] ⁺	Esteroides C21 (gluco/mineralocorticoides, progestinas) e derivados [ST0203]
413,28568	413,28503	1,56	[C ₂₇ H ₃₈ FO ₂] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
415,15146	415,15174	-0,69	[C ₂₁ H ₂₈ O ₆ +K] ⁺	Esteroides C21 (gluco/mineralocorticoides, progestinas) e derivados [ST0203]
433,18124	433,18093	0,69	[C ₂₂ H ₃₄ O ₄ S+K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
457,25413	457,25371	0,91	[C ₂₆ H ₄₂ O ₂ S+K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
463,27927	463,27943	-0,35	[C ₂₆ H ₃₉ F ₃ O ₂ +Na] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
465,24784	465,24829	-0,97	[C ₂₅ H ₃₇ O ₈] ⁺	Glucuronidos [ST0501]
466,31662	466,31631	0,65	[C ₂₆ H ₄₄ NO ₆] ⁺	Conjugados da glicina [ST0503]
479,27705	479,27679	0,53	[C ₂₈ H ₄₀ O ₅ +Na] ⁺	Vitanolidos e derivados [ST0116]
487,22936	487,23023	-1,80	[C ₂₅ H ₃₆ O ₈ +Na] ⁺	Glucuronidos [ST0501]
489,25350	489,25305	0,90	[C ₂₆ H ₄₃ O ₄ P+K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
489,25350	489,25323	0,54	[C ₂₇ H ₄₃ ClO ₃ +K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
489,29606	489,29508	1,99	[C ₂₈ H ₄₁ F ₃ O ₂ +Na] ⁺	Vitamina D2 e derivados [ST0301]
495,23934	495,23869	1,30	[C ₂₄ H ₄₀ O ₇ S+Na] ⁺	Sulfatos [ST0502]
501,27969	501,27992	-0,47	[C ₂₈ H ₄₆ O ₃ S+K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]/ Sulfatos [ST0502]
503,33160	503,33072	1,74	[C ₂₉ H ₄₆ F ₂ O ₃ +Na] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
505,24879	505,24797	1,62	[C ₂₆ H ₄₃ O ₅ P+K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
505,28959	505,28901	1,14	[C ₂₈ H ₄₄ F ₂ O ₃ +K] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
517,34706	517,34637	1,32	[C ₃₀ H ₄₈ F ₂ O ₃ +Na] ⁺	Vitamina D3 e derivados [ST0302]
523,28243	523,28203	0,75	[C ₃₀ H ₄₄ O ₅ +K] ⁺	Ácidos biliares C27, álcoois e derivados [ST0403]
523,30259	523,30300	-0,80	[C ₃₀ H ₄₄ O ₆ +Na] ⁺	Furospirostanos e derivados [ST0109]
523,30259	523,30316	-1,09	[C ₂₇ H ₄₈ O ₇ +K] ⁺	Colesterol e derivados [ST0101]
539,26058	539,26153	-1,77	[C ₂₉ H ₄₀ O ₈ +Na] ⁺	Estigmasterois e derivados do etilo C24 [ST0104]
545,28667	545,28739	-1,33	[C ₂₇ H ₄₆ O ₉] ⁺	Colesterol e derivados [ST0101]
547,40026	547,39931	1,72	[C ₃₃ H ₅₅ O ₆] ⁺	Colesterol e derivados [ST0101]
549,41578	549,41496	1,48	[C ₃₃ H ₅₇ O ₆] ⁺	Colesterol e derivados [ST0101]
590,30597	590,30614	-0,29	[C ₃₀ H ₄₇ O ₁₀ +Na] ⁺	Glucuronidos [ST0501]
611,35548	611,35543	0,06	[C ₃₄ H ₅₂ O ₈ +Na] ⁺	Vitamina D2 e derivados [ST0301]
657,36143	657,36091	0,77	[C ₃₅ H ₅₄ O ₁₀ +Na] ⁺	Outros esteroides conjugados [ST0505]

Um derivado dos ácidos biliares foi identificado como ácido (25S)-3-oxo-12 β -acetoxi-colest-1,4-dien-26-oico cujo espectro mostra um aduto de potássio a m/z 523.28243 (desvio de 0,75 ppm). Os ácidos biliares (principalmente C24 mas também C27) são produtos finais do catabolismo do colesterol nos animais. Uma das suas muitas funções é atuarem como agentes emulsificantes no intestino para ajudar na digestão e na absorção de ácidos gordos, monoacilgliceróis e outros produtos gordurosos. Também impedem a precipitação de colesterol

na bÍlis. Além disso, sabe-se atualmente que estão envolvidos na regulação de múltiplas reações biológicas (principalmente nas células hepáticas, mas também nos tecidos extra-hepáticos). Muitos ácidos biliares e álcoois ocorrem na Natureza, geralmente dependendo da espécie animal, devido às múltiplas vias enzimáticas que evoluíram para converter o colesterol nessas moléculas anfipáticas altamente solúveis em água [248],[252].

Nesta classe lipídica, os resultados obtidos nos espectros de massa sugerem os seguintes derivados das vitaminas D3 e D2:

- Adutos do dióxido de enxofre (6RS)-22-hidroxi-23,24,25,26,27-pentanorvitamina D3 6,19 e (6RS)-22-hidroxi-23,24,25,26,27-pentanorcolecalciferol 6,19 (m/z 395,22488 [M+H]⁺ e 433,18124 [M+K]⁺)
- 1 α -fluoro-25-hidroxi-16,17,23,23,24,24-hexadihidrovitamin D3 / 1 α -fluoro-25-hidroxi-16,17,23,23,24,24-hexadihidrocolecalciferol; (5Z,7E)-(1S,3R)-1-fluoro-9,10-seco-5,7,10(19),16-colestatetraeno-23-ine-3,25-diol (m/z 413,28568)
- 1 β ,25-dihidroxi-3-deoxi-3-tiavitamina D3 / 1 β ,25-dihidroxi-3-deoxi-3-tiacolecalciferol; (5Z,7E)-(1S)-9,10-seco-3-tia-5,7,10(19)-colestatriene-1,25-diol] (m/z 457,25371)
- 26,26,26-trifluoro-25-hidroxi-27-norvitamina D3 / 26,26,26-trifluoro-25-hidroxi-27-norcolecalciferol; (5Z,7E)-(3S)-26,26,26-trifluoro-27-nor-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrieno-3,25-diol (m/z 463,27927)
- 24-(dimetoxifosforil)-25,26,27-trinorvitamina D3 / 24-(dimetoxifosforil)-25,26,27-trinorcolecalciferol; (5Z,7E)-(3S)-24-(dimetoxifosforil)-9,10-seco-5,7,10(19)-colatrien-3-ol (m/z 489,25350)
- (24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hidroxivitamina D2 / (24RS)-28,28,28-trifluoro-25-hidroxiergocalciferol; (5Z,7E,22E)-(3S,24RS)-28,28,28-trifluoro-9,10-seco-5,7,10(19),22-ergostatetraeno-3,25-diol (m/z 489,29606)
- 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-26,27-dimetilvitamina D3 / 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-26,27-dimetilcolecalciferol; (5Z,7E)-(1S,3R)-24,24-difluoro-26,27-dimetil-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-1,3,25-triol (m/z 503,33160)
- 1 α -hidroxi-24-(dimetoxifosforil)-25,26,27-trinorvitamina D3 / 1 α -hidroxi-24-(dimetoxifosforil)-25,26,27-trinorcolecalciferol; (5Z,7E)-(1S,3R)-24-(dimetoxifosforil)-9,10-seco-5,7,10(19)-colatriene-1,3-diol (m/z 505,24879)

- 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-24a-homovitamina D3 / 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-24a-homocolecalciferol; (5Z,7E)-(1S,3R)-24,24-difluoro-24a-homo-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-1,3,25-triol (m/z 505,28959)
- 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-26,27-dimetil-24a-homovitamina D3 / 24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-26,27-dimetil-24a-homocolecalciferol; (5Z,7E)-(1S,3R)-24,24-difluoro-26,27-dimetil-24a-homo-9,10-seco-5,7,10(19)-colestatrien-1,3,25-triol (m/z 517,34706)
- 25-hidroxivitamina D2 25-(β -glucuronido) (m/z 611,35548)

As vitaminas são nutrientes de extrema importância no funcionamento do corpo. Os seres humanos são incapazes de produzir vitaminas, pelo que a sua entrada é feita pela ingestão de alimentos. Em geral, as vitaminas podem ser de dois tipos: hidrossolúveis (solúveis em água) e lipossolúveis (solúveis em gordura). A nível orgânico, ambas as tipologias de vitaminas são absorvidas no intestino, sendo a absorção das lipossolúveis feita com a ajuda da bÍlis produzida pelo fÍgado. A vitamina D3 ou colecalciferol - fórmula estrutural na Figura 5.9, contém dois metabolitos principais de esterol, essenciais para a regulação dos níveIs de cálcio e fósforo, e também para a formação óssea em animais, além de muitas outras funções, incluindo inibição do crescimento celular, imunomodulação, indução da diferenciação celular e controle de outros sistemas hormonais. A clivagem do 7-desidrocolesterol, um importante intermediário na biossíntese do colesterol, é mediada pela luz ultravioleta, com a abertura do segundo anel (B), na pele para produzir pré-vitamina D, que se rearranja espontaneamente para formar a vitamina secosteróide D₃.

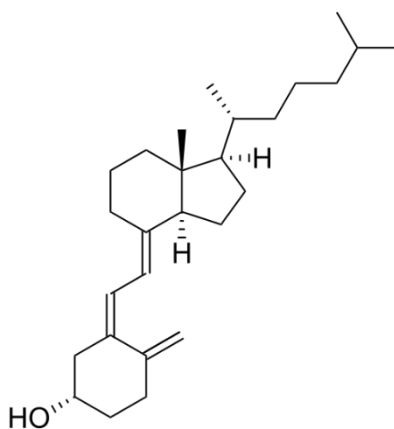


Figura 5.9 Estrutura molecular da Vitamina D₃.

A vitamina D₃ que é gerada é transportada para o fígado, e daí para o rim, para formar 1 α ,25-di-hidroxitamina D₃ (calcitriol); por ser uma hormona, serve como ligante de alta afinidade para o recetor de vitamina D em tecidos distantes. Limita-se a uma glicoproteína específica (a proteína de ligação à vitamina D (BDP)) para transporte no plasma. A vitamina D₂ ou ergocalciferol é derivada do ergosterol, que é obtido de fontes vegetais e fúngicas na dieta [253]–[255].

A espécie química dióxido de enxofre (6RS)-22-hidroxi-23,24,25,26,27-pentanorvitamina D₃ 6,19 adutada com potássio está presente em 75% dos dadores, enquanto os restantes derivados de vitaminas aparecem principalmente no dador nº 6.

Foram observadas 12 sub-classes de um total de 27 compostos policétidos: PK1213, PK1202, PK1211, PK1207, PK1209, PK1205, PK1214, PK1212, PK1210, PK1307, PK1208 e PK04 (Tabela 5.6).

Os policetídeos são metabolitos secundários de bactérias, fungos, plantas e animais. Os policetídeos são biossintetizados pela polimerização das subunidades acetil e propionil obtidas por descarboxilação da malonil coenzima A ou metilmalonil coenzima A num processo semelhante à biossíntese de ácidos gordos por meio de uma condensação de Claisen. A molécula protonada a m/z 531,31672 $[M+H]^+$ e os adutos de sódio e potássio a m/z 553,29871 $[M+Na]^+$ e 569,27235 $[M+K]^+$, respetivamente, correspondem à espécie química L-leandrosil-oleandolida, um precursor da leandomicina (*Streptomyces antibioticus*). Estes iões foram detetados em dois vestígios do dador nº 6. Na Figura 5.10 podem ser vistos os iões m/z 553.29871 e 553.32954, bem como os seus padrões isotópicos. A espécie química com fórmula $[C_{35}H_{46}O_4+Na]^+$ associada ao valor a m/z 553,32954 pertence à subclasses das calconas e dihidrocalconas [PK1212], identificada como neolinderatina. As dihidrocalconas são uma classe menor de flavonóides; apresentam dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de 3 carbonos, a qual é saturada, o que as distingue das calconas. Ocorrem no reino vegetal com uma distribuição limitada, mas heterogénea.

5 Procedimento Experimental

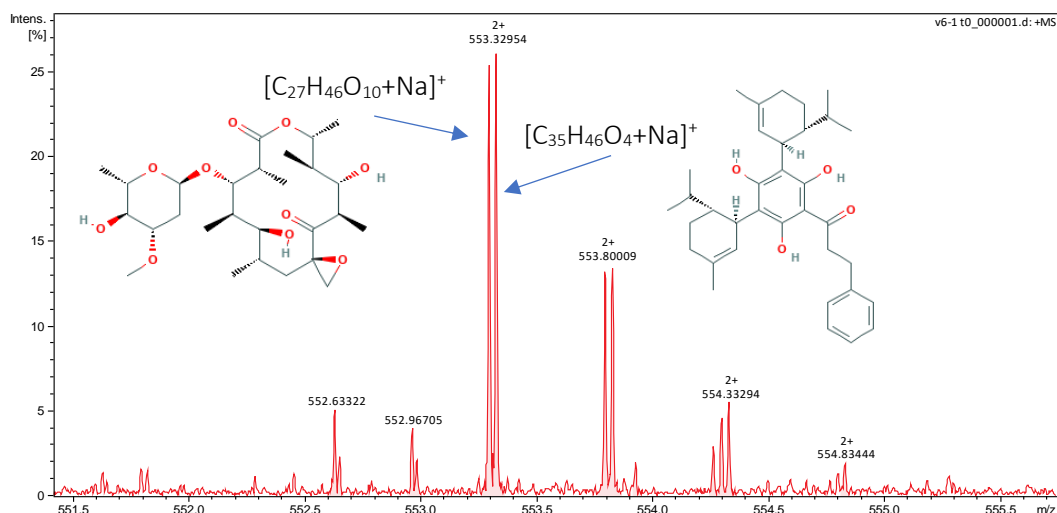


Figura 5.10 Espectro de massa de um vestígio de impressão digital do dador n°6, onde foram encontrados iões a m/z 553,29871 e 553,32954, e onde são visíveis as respectivas distribuições isotópicas.

Tabela 5.6 Iões detetados em vestígios de impressão digital sendo atribuídos à subclasse de lípidos PK.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe
Experimental	Teórico			
313,00315	313,00283	1,01	$[C_{15}H_{11}ClO_3+K]^+$	Flavenoides de Aurnas [PK1213]
321,14830	321,14852	-0,68	$[C_{21}H_{21}O_3]^+$	Flavanos, flavanois e leucoantocianidinas [PK1202]
343,13037	343,13046	0,27	$[C_{21}H_{20}O_3+Na]^+$	
359,10424	359,10440	-0,45	$[C_{21}H_{20}O_3+K]^+$	
327,09914	327,09916	-0,07	$[C_{20}H_{16}O_3+Na]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
343,07306	343,07310	-0,12	$[C_{20}H_{16}O_3+K]^+$	
371,12520	371,12537	-0,48	$[C_{22}H_{20}O_4+Na]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
387,09945	387,09931	0,33	$[C_{22}H_{20}O_4+K]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
411,18088	411,18021	1,61	$[C_{24}H_{27}O_6]^+$	Isoflavonoides [PK1205]
415,15146	415,15159	-0,32	$[C_{24}H_{24}O_5+Na]^+$	Neoflavonoides [PK1210] ou calconas e dihidrocalconas [PK1212]
431,12528	431,12553	-0,58	$[C_{24}H_{24}O_5+K]^+$	
439,04197	439,04259	-1,41	$[C_{20}H_{16}O_9+K]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
447,16547	447,16495	1,14	$[C_{23}H_{27}O_9]^+$	Flavanonas [PK1214]
475,15096	475,15159	-1,33	$[C_{29}H_{24}O_5+Na]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
493,17030	493,17043	-0,28	$[C_{24}H_{29}O_{11}]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
514,93435	514,93509	-1,44	$[C_{16}H_{12}O_{13}S_2+K]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
523,10746	523,10823	-1,47	$[C_{23}H_{23}O_{14}]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
525,15141	525,15198	-1,10	$[C_{29}H_{26}O_8+Na]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
527,15476	527,15478	0,05	$[C_{27}H_{27}O_{11}]^+$	Flavanos, flavanois e leucoantocianidinas [PK1202]
531,08900	531,08993	-1,76	$[C_{23}H_{24}O_{12}+K]^+$	Flavonas e flavonois [PK1211]
531,23481	531,23532	-0,96	$[C_{30}H_{36}O_7+Na]^+$	Flavanonas [PK1214]
531,31672	531,31637	0,65	$[C_{27}H_{47}O_{10}]^+$	Macrolidos e policetidos da lactona [PK04]
545,32595	545,32615	-0,36	$[C_{35}H_{45}O_5]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
553,29871	553,29831	0,70	$[C_{27}H_{46}O_{10}+Na]^+$	Macrolidos e policetidos da lactona [PK04]
553,32954	553,32883	1,28	$[C_{35}H_{46}O_4+Na]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
567,30784	567,30809	-0,44	$[C_{35}H_{44}O_5+Na]^+$	Calconas and dihidrocalconas [PK1212]
569,27235	569,27225	0,16	$[C_{27}H_{46}O_{10}+K]^+$	Macrolidos e policetidos da lactona [PK04]

Nesta classe, foram também identificados os seguintes compostos:

- 4'-Cloro-2-hidroxi-aurona (m/z 313,00315)
- hildgardteno (m/z 321,14830, 343,13037 e 359,10424)
- 8,8-dimetil-2-fenil-4H,8H-benzo[1,2-b:3,4-b']dipiran-4-ona (m/z 327,09914 e 343,07306)
- prebarbigerona; 7,2',4',5'-tetrametoxi-8-preniliso-flavona (m/z 411,18088)
- 5-hidroxi-7,8-dimetoxi-flavanona 5-ramnosido (m/z 447,16547)
- chamuvaritina; 1-[1,3-dihidroxi-4-[(2-hidroxifenil)metil]-9H-xanten-2-il]-3-fenil-1-propanona (m/z 475,15096)
- demetoxiisogemicalcona C; 3'-(4-Coumaroiloxi-3-metilbutil-2(E)-enyl)-2,4,2',4'-tetrahidroxicalcona (m/z 525,15141)
- viscutin 1 (m/z 527,15476)
- prorepensina; 5,3'-digeranil-3,4,2',4'-tetrahidroxicalcona (m/z 567,30784)

A espécie química 8,8-dimetil-2-fenil-4H,8H-benzo [1,2-b: 3,4-b '] dipiran-4-one foi detetada em 75% dos dados. Este composto é de origem vegetal, da família Fabaceae.

Apenas foram detetadas duas subclasses de esfingolipídios: SP0108 e SP0301 e uma subclasse de glicerolípídios: GL0201 (Tabela 5.7).

Na subclasse SP0108 apenas o Xestaminol C foi identificado nos dados n.ºs 3 e 6. Nos vestígios de impressões digitais analisadas, apenas duas fosfolipídios de ceramida foram detetadas em vestígios de diferentes dados: esfingomielinas SM (d18: 0/14: 0) e SM (d18: 2/20: 1). A esfingomielina consiste num grupo principal de fosfolipídios, esfingosina e um ácido gordo. Existem apenas alguns fosfolipídios de membrana não sintetizados a partir do glicerol, sendo este um deles. O sistema nervoso é altamente enriquecido em lipídios. Eles são necessários para funções-chave como condução rápida do impulso nervoso, sinaptogénese, neuritogénese, entre outras. As espécies lipídicas mais abundantes presentes no sistema nervoso são o colesterol, a fosfatidilcolina, a esfingomielina, a ceramida, a glucosil-ceramida e o sulfatido [256]. As fosfatidilcolinas (PCs) são os constituintes mais abundantes no cérebro. Cerca de 50% do conteúdo lipídico total, enquanto as esfingomielinas (SM) representam 10% a 25% dos fosfolipídios presentes [257]. No entanto, a epiderme também produz e fornece grandes quantidades de precursores de glucosil-ceramida e esfingomielina nos domínios extracelulares do estrato córneo, onde são hidrolisados em ceramidas. Este ciclo representa um

mecanismo que protege a epiderme contra os efeitos negativos do acúmulo de ceramida nas camadas celulares nucleadas [258].

Tabela 5.7 Iões detetados em vestígios de impressão digital atribuídos a lípidos das sub-classes SP e GL.

Massa (Da)		Desvio (ppm)	Fórmula	Sub-classe/Identificação putativa
Experimental	Teórico			
230,24750	230,24784	-1,48	$[C_{14}H_{32}NO]^+$	Análogos de base esfingóide [SP0108] /Xestoaminol C; 1-deoxi-tetradecasfinganina
408,28740	408,28745	-0,13	$[C_{22}H_{43}NO_3+K]^+$	Análogos de base esfingóide [SP0108] ou [N-acil aminas [FA0802]
663,43930	663,43853	-1,51	$[C_{40}H_{64}O_5+K]^+$	Diacylgliceróis [GL0201]/ DG(17:2(9Z,12Z)/20:5(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)/0:0) [iso2]; 1-(9Z,12Z-heptadecadienoil)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoil)-sn-glicerol
715.51601	715.51508	1.29	$[C_{37}H_{77}N_2O_6P+K]^+$	Fosfocolinas ceramidas (esfingomielinas) [SP0301]/ SM(d18:0/14:0); N-(tetradecanoil)-esfinganina-1-fosfocolina
793,56112	793,56203	-1,15	$[C_{43}H_{83}N_2O_6P+K]^+$	Fosfocolinas ceramidas (esfingomielinas) [SP0301]/ SM(d18:2/20:1); N-(11Z-eicosenoil)-4E,12Z-esfingadienina-1-fosfocolina

O 1-(9Z,12Z-heptadecadienoil)-2-(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenoil)-sn-glicerol integra a subclasse GL0201, a qual foi identificada em dois vestígios do dador nº 6.

Hidratos de carbono como a D-frutose ou outros dos seus isómeros D-alose, aldohexose, 2-deoxy-D-gluconato, D-galactose, D-hexose, galactose, cetose, entre outros) foram detetados com a fórmula $[C_6H_{12}O_6+Na]^+$, correspondendo a um aduto de sódio a m/z 203,05222 com um desvio de -1,91 ppm.

Como outros autores demonstraram, o estrato córneo intercelular é formado principalmente por ácidos gordos livres, ceramidas, esfingolípido e colesterol [259],[260]. Os lípidos polares derivados do corpo lamelar, após secreção, são ainda metabolizados no espaço extracelular do estrato córneo por enzimas co-segregadas nos corpos lamelares. As fosfolipases convertem os fosfolípidos em ácidos gordos livres e glicerol; a esfingomielinase ácida converte a esfingomielina em ceramidas (Figura 5.11). A β -glucocerebrosidase converte glucosilceramidas em ceramidas [261].

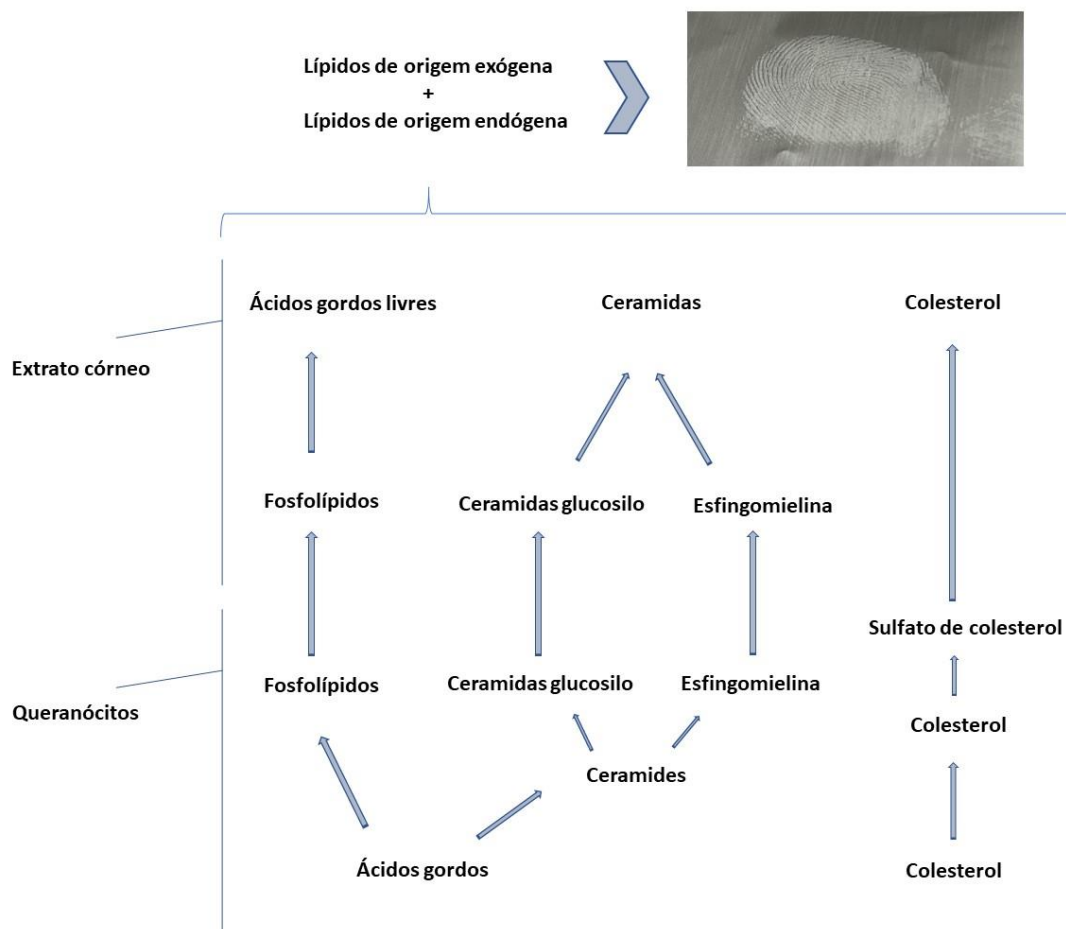


Figura 5.11 Vias lipídicas até à secreção pela pele e deposição numa superfície, adaptado de [262].

Neste estudo, também foram detetadas muitas outras classes de lípidos, pois dada a natureza da matriz, elas também podem ter origem exógena. Houve uma grande variação em termos de subclasses e quantidade de lípidos detetados nesta população de estudo como pode ser observado na Figura 5.12. Este resultado já era esperado, uma vez que a composição do material endógeno que cada indivíduo produz varia e a capacidade de secreção do suor também varia de pessoa para pessoa, no entanto, é com essa variação que serão encontrados em casos reais de investigação forense.

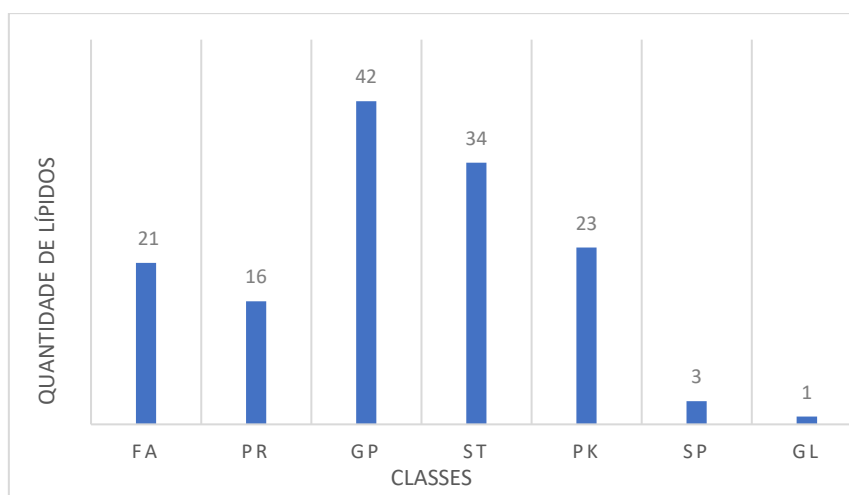


Figura 5.12 Gráfico representativo do número de lípidos indentificados por subclasse.

O metabolismo lipídico decorre através de complexas relações entre hormonas, fatores de transcrição e substratos energéticos, permitindo adaptações rápidas, o que faz com que a composição lipídica da pele varie de acordo com o estado de saúde do indivíduo [263],[264].

5.2.3.4 Diferenciação de género

A identificação do suspeito de um crime nem sempre é conseguida pelos métodos já implementados nos laboratórios forenses, pelo que determinar características intrínsecas ao indivíduo vai fornecer mais informação para a investigação criminal. Foram obtidos espectros de massa de 2 vestígios de impressões digitais dos elementos do grupo de estudo (4 elementos femininos e 4 masculinos – 2 amostras de cada dador). Os vestígios foram analisados no mesmo dia em que foram depositados nos substratos com vista a demonstrar a viabilidade da análise de pequenas moléculas na diferenciação de género.

A análise multivariada foi utilizada como base estatística. Na análise PCA foram selecionados 5 PC's com uma variância acumulada de 79%, ou seja, estes 5 PC's explicam 79% da variância observada nos dados obtidos.

Este método estatístico auxilia na elaboração de uma hipótese geral a partir dos espectros de massa. Os dados são projetados graficamente através dos componentes principais (PC's). Os *scores* fornecem informação da composição dos PC's em relação às amostras e os *loadings* em relação às variáveis. Como as PC's são ortogonais, é possível avaliar a relação entre as amostras e as variáveis. Verifica-se pela análise dos gráficos (Figura 5.13) *Hotelling T2*, *Distance to*

5 Procedimento Experimental

model e *Influence*, que existem dois *outliers* – V1-12 e V4-1, ambos de dadores do género feminino. Os resultados gráficos sugerem a existência de dois grupos, evidenciando a distinção entre género. As análises respeitantes ao género masculino apresentam pouca distância entre si e não apresentam *outliers*.

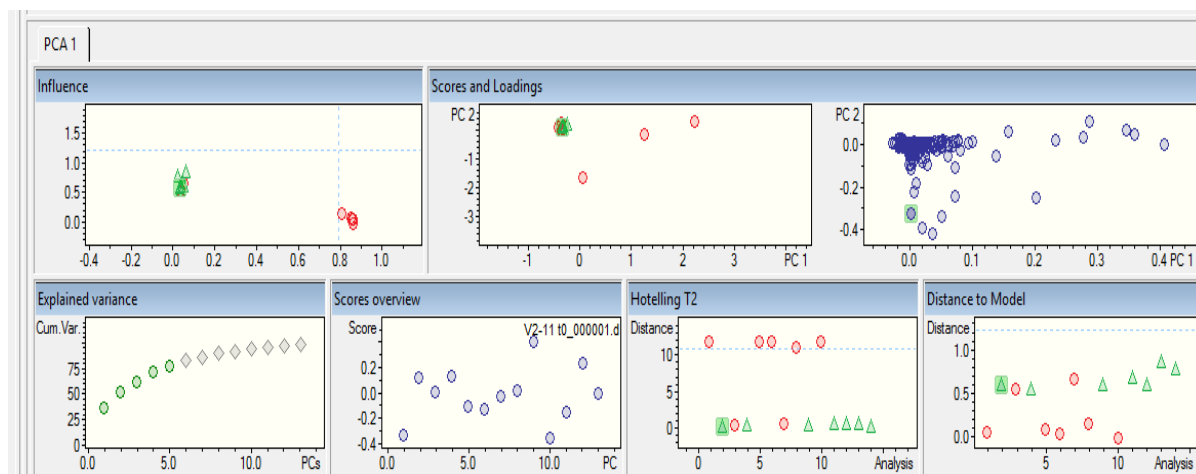


Figura 5.13 Análise dos componentes principais (PCA). Os triângulos a verde representam os vestígios de dador masculino, enquanto os círculos a vermelho representam os vestígios de dador feminino.

Pela análise de *clustering* representada na Figura 5.14 podemos observar o agrupamento hierárquico das amostras, sendo notório mais uma vez que as amostras V1-12 e V4-1 apresentam mais proximidade aos vestígios masculinos. Contudo, apesar da existência destes *outliers*, estes resultados são bastante promissores.

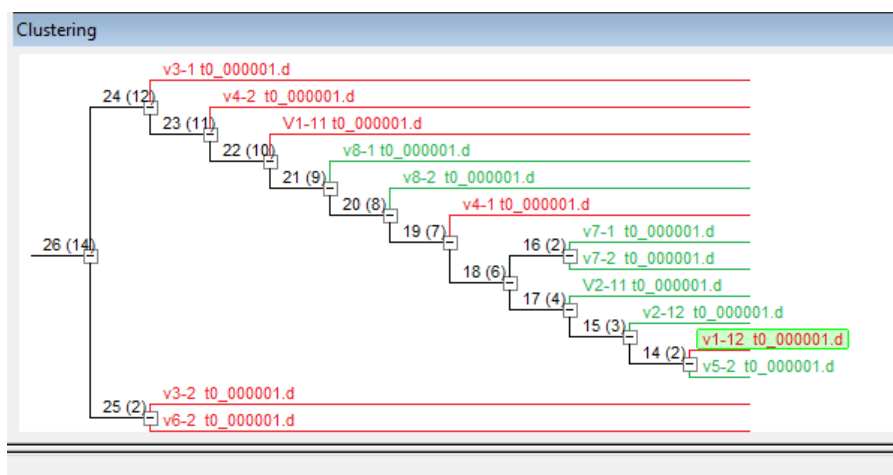


Figura 5.14 Análise de *clustering* a partir da análise de componentes principais utilizando a distância euclidiana. A cor verde representa os vestígios de dadores do género masculino, enquanto a cor vermelha representa os vestígios de dadores do género feminino.

Ferguson e seus colaboradores [6] demonstraram a utilização da espectrometria de massa MALDI na determinação do género, utilizando um modelo estatístico PLS-DA (*PLS_toolbox* v6.2.1, *Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, WA*) previamente construído onde recorreram a amostras de treino. Os resultados da *cross-validation* indicaram que existe uma grande quantidade de variação que não está relacionada com a classificação de género. Com o intuito de melhorar os resultados obtidos, estes autores efetuaram uma seleção de variáveis baseado no *Variable Importance in Projection* (VIP) e obtiveram valores de predição entre os 67,5 % e os 85%.

Os espectros de massa obtidos dos vestígios utilizados neste estudo (V1 a V8) foram ainda analisados por PLS (*Partial Least Square*) e *cross-validation* (Figura 5.15).

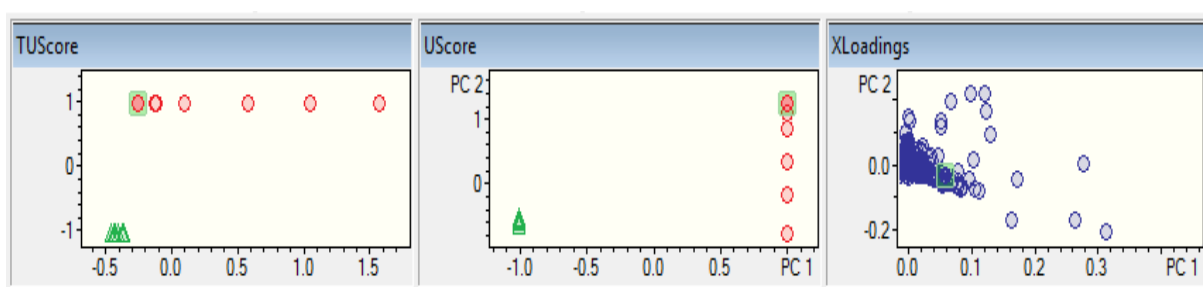


Figura 5.15 Resultados gráficos obtidos por PLS. Os triângulos a verde representam os vestígios de dador masculino, enquanto os círculos a vermelho representam os vestígios de dador feminino.

A análise por PLS (*Partial Least Square*) mostra a diferenciação entre os grupos feminino e masculino sem a existência de *outliers*. O gráfico *UScore* permite observar a homogeneidade dos dois grupos. Pela análise do gráfico *TUScore* podemos avaliar a correlação entre as amostras. As amostras dos dadores masculinos (triângulos verdes) não têm correlação com as amostras dos dadores do género feminino (círculos a vermelho).

As diferenças entre os resultados das análises PCA e PLS são explicadas pelo facto do PCA detetar a direção da variância máxima e o PLS tentar descobrir a melhor correlação entre os valores da tabela de dados utilizando combinações lineares relevantes das variáveis constantes das referidas tabelas. Esta análise deteta que parte da variância na tabela X (coluna com os valores *buckets* das diferentes amostras) melhor se ajusta aos dados da tabela Y (características de diferenciação).

Foram detetados 26 valores de *m/z* de espécies químicas apenas existentes nos vestígios de dadores do género feminino analisados e apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 Espécies químicas apenas existentes nos vestígios de dadores do género feminino.

m/z (teórico)	Fórmula química	Identificação putativa (Masstrix)	Dadores
200,08933	[C ₇ H ₁₅ NO ₄ Na] ⁺	antopleurina	3, 6
230,24784	[C ₁₄ H ₃₂ NO] ⁺	xestoaminol C	3, 6
239,04286	[C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₄ K] ⁺	ácido dihidroclavamínico	6, 1
251,08899	[C ₁₁ H ₁₆ O ₅ Na] ⁺	depdecina	3, 6
269,05343	[C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₅ K] ⁺	aspartil-L-proline	1, 6
304,03303	[C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₅ K] ⁺	ácido cetoglutárico	1, 6
333,16563	[C ₁₄ H ₂₅ N ₂ O ₇] ⁺	spectinomicina	1, 3
349,11828	[C ₂₀ H ₁₇ N ₂ O ₄] ⁺	camptotecina	3, 4, 6
350,12223	[C ₁₆ H ₁₅ F ₃ N ₅ O] ⁺	voriconazole	3, 6
369,22985	[C ₂₃ H ₃₁ NO ₃] ⁺	propantelina	1, 3, 4
370,17613	[C ₂₀ H ₂₄ N ₃ O ₄] ⁺	epanolol	1, 3, 6
374,12251	[C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₄ K] ⁺	adenosina isopentenilo	1, 4
398,23018	[C ₂₂ H ₃₃ NO ₄ Na] ⁺	icaceina	3, 6
400,14379	[C ₁₉ H ₂₂ N ₅ O ₃ S] ⁺	oxmetidina	3, 6
401,15948	[C ₂₂ H ₂₅ O ₇] ⁺	(+)-equinoisoflavanona	3, 6
410,18539	[C ₂₃ H ₃₁ O ₄ K] ⁺	9'-carboxi-gama-tocotrienol	1, 6
422,24157	[C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₄ K] ⁺	acetilleucil-leucil-norleucinal	3, 6
422,24276	[C ₂₅ H ₃₅ O ₄ Na] ⁺	11'-carboxy-gama-tocotrienol	3, 6
439,04259	[C ₂₀ H ₁₆ O ₉ K] ⁺	3,5,3'-trimetoxi-6,7:4',5'-bis(metilenodioxo)flavona	1, 6
447,16496	[C ₂₃ H ₂₇ O ₉] ⁺	5-hidroxi-7,8-dimetoxiflavanona 5-ramnosido	3, 6
456,36121	[C ₂₈ H ₄₈ FNONa] ⁺	(+/-)N-(2-fluoro-etil)-2,16,16-trimetil-5Z,8Z,11Z,14Z-tricosatetraenoilo amina	1, 4
465,17552	[C ₂₃ H ₂₉ O ₁₀] ⁺	1-(2-hidroxi-3,4,5,6-tetrametoxifenil)-3-(2,3,4,6-tetramethoifenil)-2-propeno-1-one	3, 6
487,23024	[C ₂₅ H ₃₆ O ₈ Na] ⁺	dehidroepiandrosterona 3-glucuronido	3, 6
503,33072	[C ₂₉ H ₄₆ F ₂ O ₃ Na] ⁺	24,24-difluoro-1 α ,25-dihidroxi-26,27-dimetilvitamina D3	3, 4, 6
695,35322	[C ₃₁ H ₆₁ O ₁₂ PK] ⁺	1-docosanoil-glicero-3-fosfo-(1'-mio-inositol)	3, 6
767,48573	[C ₄₂ H ₇₂ O ₁₀ P] ⁺	[Diacylglicerofosfogliceróis [GP0401]]	3, 6

Os 8 valores de m/z que foram detetados apenas nos vestígios dos dadores do género masculino são apresentados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9 Espécies químicas apenas existentes nos vestígios de dadores do género masculino.

m/z (teórico)	Fórmula química	Identificação putativa (Masstrix)	Dadores
291,07417	[C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₄ K] ⁺	3-hidroxihexobarbital	5, 7
302,96913	[C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ PS ₃] ⁺	metidation	5, 8
307,08434	[C ₁₆ H ₁₆ N ₂ O ₂ K] ⁺	ácido lisérgico	5, 7
321,14852	[C ₂₁ H ₂₁ O ₃] ⁺	hildgardtene	5, 7, 8
387,16791	[C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₃ Na] ⁺	11-metoxi-vinorina	2, 7
410,16569	[C ₁₆ H ₂₈ NO ₁₁] ⁺	(+)-equinoisoflavanona	5, 7
471,18904	[C ₂₆ H ₂₈ N ₂ O ₅ Na] ⁺	obliquina	5, 7
532,25891	[C ₂₀ H ₃₉ N ₅ O ₁₀ Na] ⁺	N3'-acetiltobramicina	7, 8

Esta experiência consistiu numa abordagem preliminar, sendo necessário o alargamento da população de estudo.

5.2.3.5 Detecção do explosivo TATP

O *Global Terrorism Index* (GTI), publicado em 2016, analisou o impacto do terrorismo em 163 países, indicando 29.376 mortes em todo o mundo, por via do terrorismo, sendo 2015 o ano com mais mortes. Os dados deste estudo indicam claramente uma maior incidência de ataques na Europa nos últimos anos [265].

Nos atentados em Paris em 2015, bem como em Bruxelas em 2016 e Barcelona em 2017, que resultaram em inúmeras mortes e feridos graves, foi utilizado o triperóxido de triacetona (3,3,6,6,9,9-hexametil-1,2,4,5,7,8-hexonano), também conhecido como TATP. Este é um dos explosivos artesanais facilmente fabricados com produtos de venda livre, fornecendo 80% da potência explosiva do TNT. Após o ataque em Bruxelas, quinze quilos de TATP, 150 litros de acetona, 30 litros de peróxido de hidrogénio, detonadores e uma mala cheia de pregos e parafusos foram encontrados no apartamento dos bombistas-suicidas. Este é apenas um exemplo recente do uso de um material explosivo de alta energia, fabricado à mão. O *Conflict Armament Research* publicou em fevereiro de 2017 um relatório intitulado “*Tracing the supply of components used in Islamic State IEDs*”, realizado numa investigação de 20 meses no Iraque e na Síria, descrevendo a existência de uma rede de 51 empresas com sede em vinte países, incluindo a Turquia, Rússia, Brasil, Bélgica, Áustria, Holanda, China e Estados Unidos, que forneceram ao Estado Islâmico os componentes necessários para o fabrico de explosivos artesanais em larga escala. Estas empresas teriam produzido, vendido, ou recebido produtos químicos precursores, cordões detonantes, detonadores e outros componentes eletrónicos [266]. O uso deste tipo de explosivos não se restringe ao terrorismo, sendo usados em muitos outros atos criminosos tipificados na legislação internacional, como o rebentamento de caixas automáticas de levantamento de dinheiro (comumente denominadas de multibancos ou ATM's) [267].

O TATP foi identificado e caracterizado por espectrometria de massa por um laboratório forense pela primeira vez em Israel [268],[269]. Este composto é um peróxido orgânico, que pode ser sintetizado usando acetona, peróxido de hidrogénio e um ácido, como ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, como catalisador. Os peróxidos orgânicos são compostos que contêm um ou mais grupos funcionais R-O-O-R, sendo que as ligações peróxido conferem ao TATP uma característica explosiva, altamente degradável e sensível ao calor, impacto e atrito [270].

O TATP foi estudado por inúmeras técnicas [271]. Este composto foi detetado por sensores eletroquímicos [272],[273], por luminescência [274],[275] e até por métodos biológicos [276].

A espectrometria de mobilidade iónica é amplamente utilizada em aplicações práticas, como por exemplo em aeroportos [277],[278]. No entanto, a sua falta de eficácia já foi reportada, pelo que, novas metodologias de acoplamento a esta técnica têm sido estudadas [279]–[282]. A cromatografia líquida[283],[284] e a cromatografia gasosa foram usadas na separação e identificação de TATP. Técnicas espectroscópicas de infravermelho [285] e Raman [286],[287], também são usadas para a identificação deste composto.

A espectrometria de massa tornou-se uma ferramenta essencial para a identificação e caracterização de TATP, assim como para outros compostos, quer acoplada a técnicas de separação tal como mencionado anteriormente, ou usada diretamente [288],[289]. Nos últimos anos, foram desenvolvidos métodos de espectrometria de massa em ambiente de ionização, bem como a sua aplicação forense demonstrada por vários autores. Cooks e colaboradores [290]–[293] mostraram o potencial da espectrometria de massa de desorção de ionização por electrospray (DESI) na análise de explosivos. Desenvolveram um processo de análise “remota” em que o ião $[TATP+Na]^+$ e outros como o ciclo-1,3,5-trimetileno-2,2,6-trinitramina (RDX) foram detetados e, a partir dos quais, foram capazes de recolher mais informações. Um método rápido utilizando LC-QToF-MS foi usado por Detata e seus colaboradores [294] na análise e caracterização de vários explosivos, incluindo o TATP. A APCI também foi utilizada para a ionização das amostras acima mencionadas. Outros trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando ESI [295] e APCI para a deteção de explosivos contendo o grupo nitro [296]–[299], nos modos negativo e positivo, enquanto os peróxidos explosivos foram analisados por ionização positiva [284],[300]–[303]. Outros autores utilizaram a espectrometria de massa para detetar nitro explosivos em vestígios de impressões digitais ou diretamente a partir da superfície dos dedos por meio de DART-MS [102],[304] e DESI-MS [305],[306]. Impressões digitais com resíduos de explosivos podem estar associadas ao planeamento ou manuseamento de uma bomba, o que torna a sua deteção crucial na investigação forense [94],[307].

O presente estudo tem como objetivo a caracterização química do TATP tirando partido da extrema resolução e exactidão de massa do FT-ICR. Para determinar a origem deste explosivo, é necessário não apenas identificá-lo de maneira inequívoca, mas também detetar outros componentes químicos utilizados na sua preparação, como por exemplo, discriminar se foi utilizado ácido clorídrico ou, ao invés, ácido sulfúrico. A introdução destes compostos numa base de dados de espectros também permitirá a sua deteção em vestígios de impressões digitais, pelo que os dados obtidos terão desta forma maior valor forense em investigações criminais.

As imagens de cristais de TATP foram obtidas a partir de várias sínteses por microscopia ótica (Figura 5.16). Após as sínteses 1-3, os produtos foram armazenados em *vials* cobertos com parafilme. O mesmo procedimento foi realizado após a apreensão do produto de síntese 4 para análise forense.

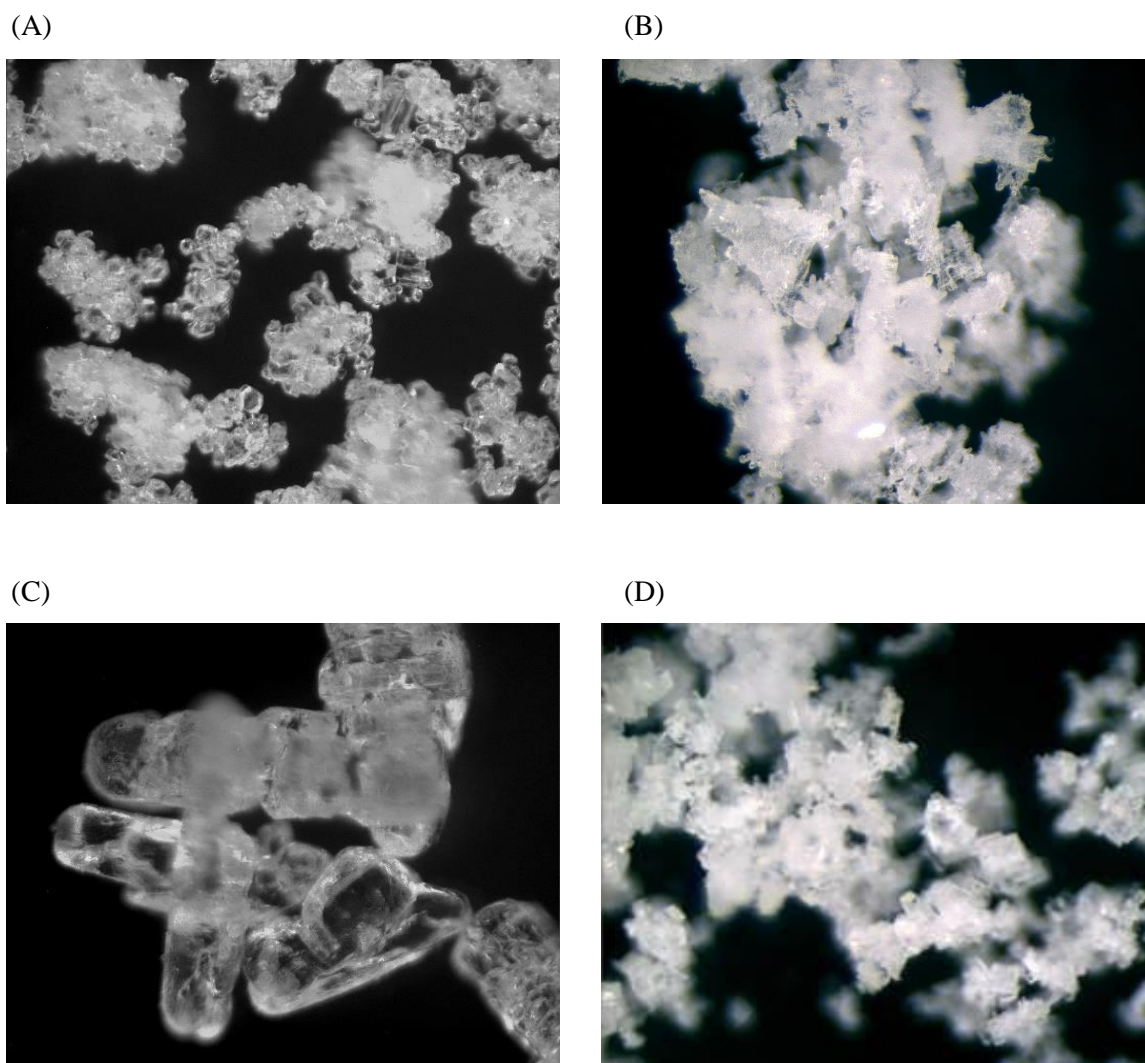


Figura 5.16 Imagens de cristais de TATP sintetizados com HCl - síntese 1 (A) e síntese 4 (D), ácido muriático - síntese 2 (B), e ácido sulfúrico - síntese 3 (C), ampliação 100x.

As imagens mostraram que os cristais de TATP sintetizados com ácido sulfúrico (imagem C) são maiores do que os cristais resultantes das sínteses 1, 2 e 4. A morfologia dos cristais das sínteses 2 e 4 é muito semelhante. No entanto, é importante notar que o TATP é um composto instável que recristaliza e sublima espontaneamente, mesmo à temperatura ambiente, facto que produz alterações na morfologia dos cristais [270]. Segundo estes autores, a sensibilidade ao atrito dos explosivos depende da forma e tamanho dos cristais.

O ácido é utilizado na síntese de TATP como um catalisador, que permanece em quantidades vestigiais no produto final. Essa quantidade residual tem um forte impacto nas propriedades do TATP, a saber: estabilidade térmica, modificação alotrópica, transformação do TATP em DADP (3,6,6,6-tetrametil-1,2,4,5-tetraoxano) e estabilidade em solução [308]–[310].

Muitos autores estudaram diferentes técnicas de detecção e análise do TATP e, portanto, a degradação e decomposição de peróxidos orgânicos também foram investigadas. Da literatura encontrada, apenas Alan G. Marshall e seus colaboradores, em 2002 [311], utilizaram a espectrometria de massa ESI-FT-ICR na análise de explosivos. No entanto, este estudo concentrou-se apenas nos explosivos convencionais TNT, RDX, HMX, pólvora sem fumo, *Powermite* e C4.

Os espectros de massa de alta resolução, adquiridos no modo positivo, dos compostos das sínteses 1 a 4 são apresentados na Figura 5.17. Estes espectros foram adquiridos com 1s de acumulação na célula de colisão e sem qualquer adição de compostos que promovam ionização.

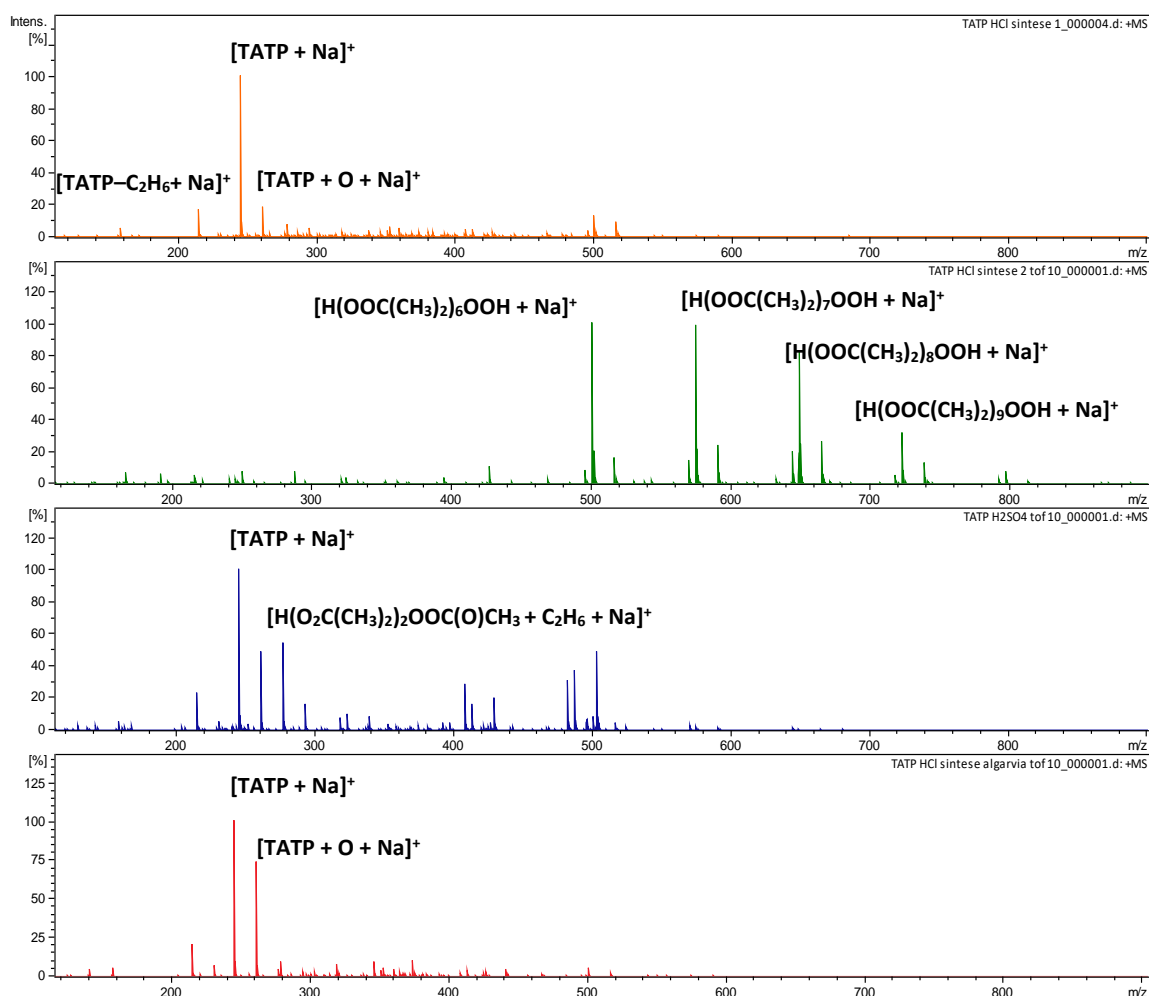


Figura 5.17 Espectro de massa ESI FTICR do explosivo TATP – síntese 1-4.

5 Procedimento Experimental

Os resultados mostram a existência inequívoca de TATP (Figura 5.18) em todos os produtos das sínteses em análise – ver Tabelas 5.10 a 5.13.

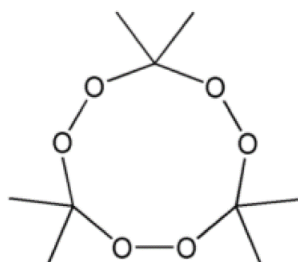


Figura 5.18 Fórmula de estrutura do TATP ($C_9H_{18}O_6$).

Tabela 5.10 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 1 do TATP.

m/z (Da)		Desvio (ppm)	Fórmula	Identificação	Intensidade relativa (%)
Experimental	Teórico				
215,05286	215,05261	-1,1	$C_7H_{12}NaO_6^+$	$[TATP + Na - C_2H_6]^+$	15
221,04241	221,04220	-1,0	$C_6H_{14}KO_6^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_2OOH + K]^+$	<1
240,14454	240,14416	-1,6	$C_9H_{22}NO_6^+$	$[TATP + NH_4]^+$	<1
245,09981	245,09956	-1,1	$C_9H_{18}NaO_6^+$	$[TATP + Na]^+$	100
261,07385	261,07345	-1,4	$C_9H_{18}KO_6^+$	$[TATP + K]^+$	5
261,09477	261,09447	1,2	$C_9H_{18}NaO_7^+$	$[TATP + O + Na]^+$	19
274,14991	274,14964	-0,9	$C_9H_{24}NO_8^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_3OOH + NH_4]^+$	<1
279,10528	279,10504	-0,9	$C_9H_{20}NaO_8^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_3OOH + Na]^+$	8
295,07919	295,07898	+0,7	$C_9H_{20}NO_8^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_3OOH + K]^+$	5
319,13654	319,13634	-0,6	$C_{12}H_{24}NaO_8^+$	$(TrATrP + Na)^+$	3
321,11583	321,11560	+0,7	$C_{11}H_{22}NaO_9^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_3OOC(O)CH_3 + Na]^+$	1
337,08975	337,08954	+0,6	$C_{11}H_{22}KO_9^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_3OOC(O)CH_3 + K]^+$	<1
348,18688	348,18642	-1,3	$C_{12}H_{30}NO_{10}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_4OOH + NH_4]^+$	1
353,14206	353,14182	-0,7	$C_{12}H_{26}NaO_{10}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_4OOH + Na]^+$	5
369,11599	369,11576	+0,6	$C_{12}H_{26}KO_{10}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_4OOH + K]^+$	3
395,15276	395,15238	-0,7	$C_{14}H_{28}NaO_{11}^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_4OOC(O)CH_3 + Na]^+$	1
411,12692	411,12632	+1,5	$C_{14}H_{28}KO_{11}^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_4OOC(O)CH_3 + K]^+$	<1
422,22352	422,22320	-0,7	$C_{15}H_{36}NO_{12}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_5OOH + NH_4]^+$	<1
427,17903	427,17859	-1,0	$C_{15}H_{32}NaO_{12}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_5OOH + Na]^+$	3
443,15288	443,15254	+0,8	$C_{15}H_{32}KO_{12}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_5OOH + K]^+$	2
469,18966	469,18916	-1,1	$C_{17}H_{34}NaO_{13}^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_5OOC(O)CH_3 + Na]^+$	1
485,16361	485,16310	+1,1	$C_{17}H_{34}KO_{13}^+$	$[H(O_2C(CH_3)_2)_5OOC(O)CH_3 + K]^+$	<1
496,26041	496,25998	-0,9	$C_{18}H_{42}NO_{14}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + NH_4]^+$	4
501,21974	501,21537	+0,7	$C_{18}H_{38}NaO_{14}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + Na]^+$	13
517,18984	517,18931	+1,0	$C_{18}H_{38}KO_{14}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + K]^+$	9
575,25261	575,25216	-0,8	$C_{21}H_{44}NaO_{16}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_7OOH + Na]^+$	<1%
591,22686	591,22609	-1,26	$C_{21}H_{44}KO_{16}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_7OOH + K]^+$	<1%
649,28846	649,28894	+0,7	$C_{24}H_{50}NaO_{18}^+$	$[H(OOC(CH_3)_2)_8OOH + Na]^+$	<1

5 Procedimento Experimental

Tabela 5.11 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 2 do TATP.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Identificação	Intensidade relativa (%)
Experimental	Teórico				
215,05285	215,05261	+1,1	C ₇ H ₁₂ NaO ₆ ⁺	[TATP+Na – C ₂ H ₆] ⁺	<1
245,09984	245,09956	-1,1	C ₉ H ₁₈ NaO ₆ ⁺	[TATP+Na] ⁺	3
321,11576	321,11560	0,5	C ₁₁ H ₂₂ NaO ₉ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₃ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	3
353,14206	353,14182	-1,5	C ₁₂ H ₂₆ NaO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH+Na] ⁺	1
395,15243	395,15238	-0,7	C ₁₄ H ₂₈ NaO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	4
411,12695	411,12632	+1,5	C ₁₄ H ₂₈ KO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
422,22374	422,22320	-1,2	C ₁₅ H ₃₆ NO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + NH ₄] ⁺	1
427,17942	427,17860	-0,9	C ₁₅ H ₃₂ NaO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH+Na] ⁺	11
469,18962	469,18916	+1,0	C ₁₇ H ₃₄ NaO ₁₃ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₅ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	3
485,16382	485,16310	+1,5	C ₁₇ H ₃₄ KO ₁₃ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₅ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
496,26041	496,25998	-0,9	C ₁₈ H ₄₂ NO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + NH ₄] ⁺	82
501,21575	501,21538	+0,7	C ₁₈ H ₃₈ NaO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH+Na] ⁺	100
517,18989	517,18931	+1,1	C ₁₈ H ₃₈ KO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH+K] ⁺	17
543,22604	543,22594	-0,2	C ₂₀ H ₄₀ NaO ₁₅ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₆ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	2
570,29734	570,29676	-1,0	C ₂₁ H ₄₈ NO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + NH ₄] ⁺	15
575,25276	575,25216	+1,0	C ₂₁ H ₄₄ NaO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH+Na] ⁺	99
591,22660	591,22609	+0,9	C ₂₁ H ₄₄ KO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH+K] ⁺	24
649,28897	649,28894	+0,1	C ₂₄ H ₅₀ NaO ₁₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₈ OOH+Na] ⁺	82
723,32739	723,32571	-2,3	C ₂₇ H ₅₆ NaO ₂₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₉ OOH+Na] ⁺	32
797,36475	797,36490	0,2	C ₃₀ H ₆₂ NaO ₂₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₁₀ OOH+Na] ⁺	8

5 Procedimento Experimental

Tabela 5.12 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 3 do TATP.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Identificação	Intensidade relativa (%)
Experimental	Teórico				
215,05284	215,05261	+1,1	C ₇ H ₁₂ NaO ₆ ⁺	[TATP+Na – C ₂ H ₆] ⁺	23
221,04239	221,04220	-0,9	C ₆ H ₁₄ KO ₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₂ OOH + K] ⁺	<1
245,09983	245,09956	-1,1	C ₉ H ₁₈ NaO ₆ ⁺	[TATP+Na] ⁺	100
261,07397	261,07345	-1,8	C ₉ H ₁₈ KO ₆ ⁺	[TATP+K] ⁺	3
261,09477	261,09447	-1,1	C ₉ H ₁₈ NaO ₇ ⁺	[TATP + O + Na] ⁺	49
277,12602	277,12577	+0,9	C ₁₀ H ₂₂ NaO ₇ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₂ OOC(O)CH ₃ + C ₂ H ₆ + Na] ⁺	54
279,10533	279,10504	-1,0	C ₉ H ₂₀ NaO ₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₃ OOH + Na] ⁺	2
293,09993	293,09971	-0,7	C ₁₀ H ₂₂ KO ₇ ⁺	[TATP + CH ₄ + K] ⁺	15
295,07923	295,07898	+0,9	C ₉ H ₂₀ NO ₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₃ OOH + K] ⁺	1
321,11583	321,11560	+0,7	C ₁₁ H ₂₂ NaO ₉ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₃ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	<1
348,18662	348,18642	+0,6	C ₁₂ H ₃₀ NO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH + NH ₄] ⁺	1
353,14207	353,14182	-0,7	C ₁₂ H ₂₆ NaO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH+Na] ⁺	4
369,11616	369,11576	-1,0	C ₁₂ H ₂₆ KO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH+K] ⁺	1
395,15243	395,15238	+0,8	C ₁₄ H ₂₈ NaO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	1
411,12678	411,12632	+1,5	C ₁₄ H ₂₈ KO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
422,22367	422,22320	-1,1	C ₁₅ H ₃₆ NO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + NH ₄] ⁺	3
427,17907	427,17860	-1,1	C ₁₅ H ₃₂ NaO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + Na] ⁺	5
443,15303	443,15254	+1,1	C ₁₅ H ₃₂ KO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + K] ⁺	2
469,18955	469,18916	+0,8	C ₁₇ H ₃₄ NaO ₁₃ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₅ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	1
496,26059	496,25998	-1,2	C ₁₈ H ₄₂ NO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + NH ₄] ⁺	7
501,21584	501,21538	+0,9	C ₁₈ H ₃₈ NaO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + Na] ⁺	8
570,29768	570,29676	-1,6	C ₂₁ H ₄₈ NO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + NH ₄] ⁺	3
517,19001	517,18931	+1,3	C ₁₈ H ₃₈ KO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + K] ⁺	5
575,25271	575,25216	-0,7	C ₂₁ H ₄₄ NaO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + Na] ⁺	3
591,22688	591,22609	-1,3	C ₂₁ H ₄₄ KO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + K] ⁺	1
649,28709	649,28894	-1,2	C ₂₄ H ₅₀ NaO ₁₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₈ OOH + Na] ⁺	1
723,32715	723,32571	-2,3	C ₂₇ H ₅₆ NaO ₂₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₉ OOH + Na] ⁺	<1
797,36293	797,36249	-0,5	C ₃₀ H ₆₂ NaO ₂₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₁₀ OOH + Na] ⁺	<1

5 Procedimento Experimental

Tabela 5.13 Alguns iões observados por ESI FT-ICR MS da síntese 4 do TATP.

m/z		Desvio (ppm)	Fórmula	Identificação	Intensidade relativa (%)
Experimental	Teórico				
205.06850	205.06826	-1.2	C ₆ H ₁₄ NaO ₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₂ OOH + Na] ⁺	1
215.05285	215.05261	-1.1	C ₇ H ₁₂ NaO ₆ ⁺	[TATP+Na – C ₂ H ₆] ⁺	21
221.04245	221.04220	-1.2	C ₆ H ₁₄ KO ₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₂ OOH + K] ⁺	1
240.14436	240.14416	-0.8	C ₉ H ₂₂ NO ₆ ⁺	[TATP + NH ₄] ⁺	<1
245.09981	245.09956	-1.0	C ₉ H ₁₈ NaO ₆ ⁺	[TATP + Na] ⁺	100
261.09477	261.09447	1.1	C ₉ H ₁₈ NaO ₇ ⁺	[TATP + O + Na] ⁺	74
279.10528	279.10504	-0.9	C ₉ H ₂₀ NaO ₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₃ OOH + Na] ⁺	9
319.13656	319.13634	-0.7	C ₁₂ H ₂₄ NaO ₈ ⁺	(TrATrP + Na) ⁺	<1
321.11567	321.11560	+0.2	C ₁₁ H ₂₂ NaO ₉ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₃ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	<1
337.08978	337.08954	+0.7	C ₁₁ H ₂₂ KO ₉ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₃ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
353.14204	353.14182	+0.6	C ₁₂ H ₂₆ NaO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH + Na] ⁺	6
369.11599	369.11576	+0.7	C ₁₂ H ₂₆ KO ₁₀ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₄ OOH + K] ⁺	2
395.15266	395.15238	-0.7	C ₁₄ H ₂₈ NaO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	1
411.12661	411.12632	+0.7	C ₁₄ H ₂₈ KO ₁₁ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₄ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
422.22352	422.22320	-0.8	C ₁₅ H ₃₆ NO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + NH ₄] ⁺	<1
427.17901	427.17859	-1.0	C ₁₅ H ₃₂ NaO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + Na] ⁺	3
443.15916	443.15254	-0.9	C ₁₅ H ₃₂ KO ₁₂ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₅ OOH + K] ⁺	1
469.18978	469.18916	-1.1	C ₁₇ H ₃₄ NaO ₁₃ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₅ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	1
485.16381	485.16310	+1.5	C ₁₇ H ₃₄ KO ₁₃ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₅ OOC(O)CH ₃ + K] ⁺	<1
496.26053	496.25998	-1.1	C ₁₈ H ₄₂ NO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + NH ₄] ⁺	<1
501.21582	501.21537	+0.9	C ₁₈ H ₃₈ NaO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + Na] ⁺	5
517.18992	517.18931	+1.2	C ₁₈ H ₃₈ KO ₁₄ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₆ OOH + K] ⁺	3
543.22561	543.22594	-0.6	C ₂₀ H ₄₀ NaO ₁₅ ⁺	[H(O ₂ C(CH ₃) ₂) ₆ OOC(O)CH ₃ + Na] ⁺	<1
570.29651	570.29676	+0.4	C ₂₁ H ₄₈ NO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + NH ₄] ⁺	<1
575.25272	575.25216	-1.3	C ₂₁ H ₄₄ NaO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + Na] ⁺	1
591.22660	591.22609	-0.7	C ₂₁ H ₄₄ KO ₁₆ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₇ OOH + K] ⁺	<1
649.28911	649.28894	+0.3	C ₂₄ H ₅₀ NaO ₁₈ ⁺	[H(OOC(CH ₃) ₂) ₈ OOH + Na] ⁺	<1

Milas e seus colaboradores evidenciaram a formação de oligoperóxidos [312]–[314] como produtos da síntese de cetonas com peróxido de hidrogénio na presença de iões hidrogénio, no entanto, estudos mais recentes usando a espectrometria de massa ESI-MS permitiram confirmar a presença deste tipo de compostos como intermediários ou *by-products* na síntese de TATP [302][315]. Os compostos identificados nas Tabelas 5.11 a 5.13 mostram também a capacidade dos iões Na⁺, K⁺ e NH₄⁺ de se ligarem seletivamente ao TATP. Nos espectros da síntese 1, 3 e 4, observa-se o aduto de sódio [TATP + Na]⁺ (m/z 245,09956), enquanto na síntese 2, embora presente, apresenta uma abundância relativa de apenas 3%. O espectro CID (dissociação induzida por colisão) deste ião mostra um produto de fragmentação com m/z 215,05286 [C₇H₁₂NaO₆⁺] (100%) por perda de etano (30,04670 Da). Este ião é observado nos espectros de todas as sínteses em estudo.

O íon mais abundante observado na síntese de 2 corresponde ao oligoperóxido de sódio $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + Na]^+$ (m/z 501,21538). Nas sínteses 1 e 4 observa-se o aduto de amónio do TATP $[TATP + NH_4]^+$ (m/z 240,14416). A sua associação com o potássio, ou seja, o aduto de potássio, é observado nas sínteses 1 e 3 $[TATP + K]^+$ (m/z 261,07345) com abundâncias relativamente baixas. O íon a m/z 261,09447 nos espectros das sínteses 1, 3 e 4 com as abundâncias relativas de 19, 49 e 74, respetivamente, pode ser atribuído à fórmula química $[C_9H_{18}NaO_7]^+$ e sendo originado a partir do íon a m/z 231,04782 (100%) por perda de 30,04698 Da (C_2H_6) e a m/z 215,05287 (20%) por CID. O aduto de sódio do tetramero de TATP (tetra-peróxido de tetracetona; 3,3,6,6,9,9,12,12-octametil-1,2,4,5,7,8,10,11-octaoxaciclododecano) (TrATrP + Na)⁺ a m/z 319,13634 é observado apenas nas sínteses 1 e 4. Este composto foi previamente detetado por Schulte-Ladbeck [316] e Egorshev [317].

Em todas as amostras de TATP, foram detetadas seis séries de peróxidos oligoméricos. Os oligómeros dihidroperoxi ($[H(OOC(CH_3)_2)_nOOH]$) estão presentes na síntese 1 com adutos de sódio com $n = 2$ a 8, potássio com $n = 3$ a 7 e amónio com $n = 3$ a 7. Todos estes compostos têm uma abundância relativa baixa, tendo o oligómero com o aduto de sódio $n = 6$ uma abundância mais elevada. As séries oligoméricas de óxidos de carbonilo $[H(O_2C(CH_3)_2)_nOOC(O)CH_3]^+$ distam dos hidroperóxidos da série oligomérica anterior $[H(OOC(CH_3)_2)_nOOH]$ em 74 Da. Os adutos de sódio e potássio com $n = 3$ a 5 com muito baixa abundância relativa estão presentes nesta síntese.

A síntese 2 difere das restantes, porque apresenta um predomínio de íões a m/z 353,14206 (1%), 427,17942 (11%), 501,21575 (100%), 575,25276 (99%), 649,28897 (82%), 723,32739 (32%) e 797,36475 (8%) e correspondem à série $[H(OOC(CH_3)_2)_nOOH]$ com $n = 4$ a 10, respetivamente. Estes íões estão separados por 74 Da correspondendo a $C_3H_6O_2$. As experiências CID suportam estas identificações, como mostra a Figura 5.19. Todos os íões constantes nesta Figura iniciam um processo de fragmentação envolvendo migração do metilo de um carbono terciário para o oxigénio ao longo da cadeia, resultando numa perda de 106,062446 Da $[HOOC(CH_3)_2OCH_3]$. O íon aduto em $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + Na]^+$ a m/z 501,21557 fragmenta dando origem aos produtos de fragmentação a m/z 395,15255, 321,11571, 247,07907 e 215,0581 atribuídos a $[C(O_2C(CH_3)_2)_4OOC(O)CH_3 + Na]^+$, $[H(O_2C(CH_3)_2)_3OOC(O)CH_3 + Na]^+$, $[H(O_2C(CH_3)_2)_2OOC(O)CH_3 + Na]^+$ e $[TATP - C_2H_6 + Na]^+$, respetivamente. Esta via é comum ao processo de fragmentação dos íões a m/z 575, 649, 723, 727 e 797. No entanto, o íon fragmento $[H(O_2C(CH_3)_2)_5OOC(O)CH_3 + Na]^+$ a m/z 469 ainda está presente. Os íões a m/z 649,28948, 723,32638 e 797,36475 ainda apresentam o

5 Procedimento Experimental

produto de fragmentação a m/z 543, que corresponde ao aduto de sódio $[C(O_2C(CH_3)_2)_6OOC(O)CH_3 + Na]^+$. O íon a m/z 723,32638 produz um produto de fragmentação a m/z 617,26325 $[C(O_2C(CH_3)_2)_7OOC(O)CH_3 + Na]^+$, também comum à fragmentação do íon com m/z 797,36475. O íon a m/z 691,30306 está apenas presente na via de fragmentação do íon a m/z 797, correspondente ao aduto de sódio $[H(O_2C(CH_3)_2)_8OOC(O)CH_3 + Na]^+$. Um dos maiores picos de abundância relativa (82%) corresponde ao aduto de amónio do oligômero $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + NH_4]^+$.

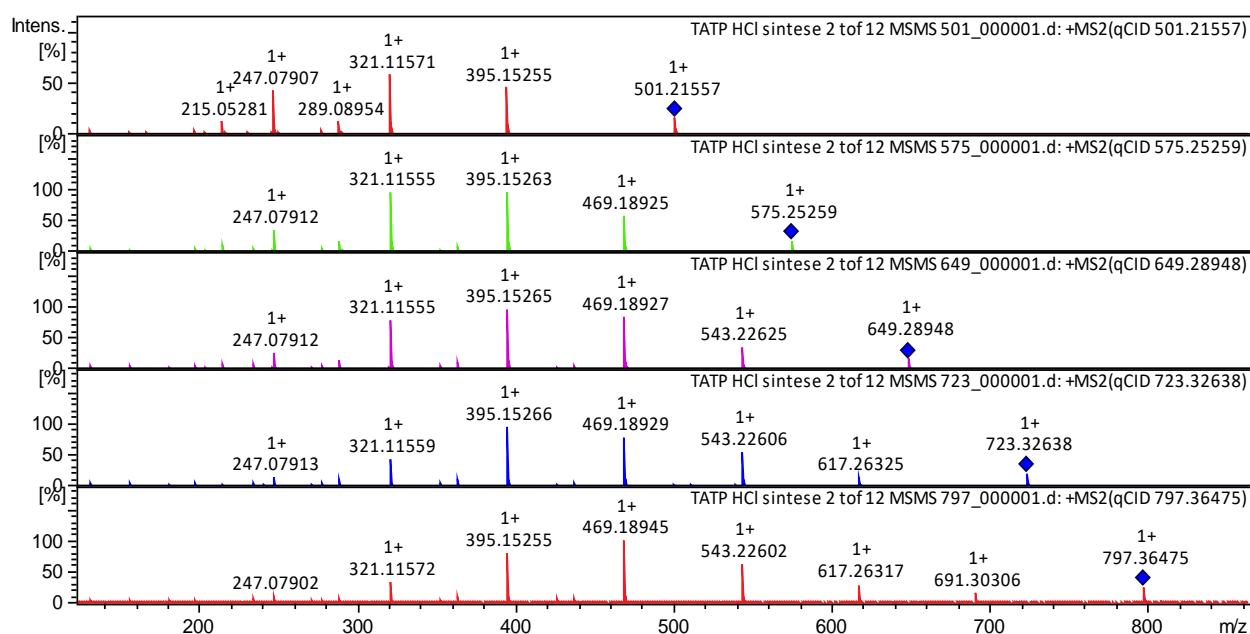


Figura 5.19 Experiências CID dos íões a m/z 501,21557; 575,25259; 649,28948; 723,32638 e 797,36475.

O espectro da síntese 3 mostra o oligômero m/z 277,12602, com uma abundância relativa de 54%, cuja identidade é $[C(O_2C(CH_3)_2)_2OOC(O)CH_3 + C_2H_6 + Na]^+$. A fragmentação deste composto em condições CID origina produtos de fragmentação a m/z 247.07903 (23%) $[H(O_2C(CH_3)_2)_2OOC(O)CH_3]$ por perda de C_2H_6 (30,04702 Da) e 245.09985 (56%) $[TATP + Na]^+$ por perda de CH_3OH (32,0262 Da). A fragmentação do íon a m/z 245,09985 dá origem ao produto de fragmentação a m/z 215.05276 por perda de C_2H_6 (30,04709 Da). A razão de íões a m/z 245,09983 (100%), 261,09477 (49%) e 277,12602 (54%) é característica desta síntese realizada com ácido sulfúrico como catalisador. Não foi possível identificar os íões a m/z 487,10950 (37%) e 503,08333 (49%), característicos apenas desta síntese. Os *clusters* $[H(OOC(CH_3)_2)_nOOH + Na]^+$, com $n = 3$ a 10 foram detetados, a série com o aduto de potássio $[H(OOC(CH_3)_2)_nOOH + K]^+$ foi detetada com $n = 2$ a 7, e a série adutada com

amónio está presente com $n = 4$ a 6 . Os oligómeros $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{Na}]^+$ estão presentes nesta síntese com $n = 3$ a 5 , enquanto que para o aduto de potássio apenas o *cluster* com $n = 4$ está presente.

O produto da síntese 4 tem um espectro de massa semelhante ao da síntese 1, embora tenham sido observadas diferentes relações de intensidade entre iões abundantes a m/z 245,09981 (100%) e 261,09477 (74%). Estas duas sínteses foram realizadas por pessoas diferentes sob condições diferentes, mas ambas usaram HCl como ácido catalisador. Esta foi a única síntese em que o ião a m/z 205,06850 $[\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NaO}_6]^+$ foi detetado, o que corresponde à espécie $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_2\text{OOH} + \text{Na}]^+$. Do mesmo modo que nas outras sínteses, foram detetados alguns dos oligómeros característicos da síntese do TATP: $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{Na}]^+$ com $n = 2$ a 8 , $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{K}]^+$ com $n = 2$ e $n = 4$ a 7 , $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{NH}_4]^+$ com $n = 5$ e 6 , $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{Na}]^+$, com $n = 3, 4$ e 6 , $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{K}]^+$, com $n = 3$ a 5 e $[\text{C}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{NH}_4]^+$ com $n = 5$ e 7 .

As quantidades relativas de oligoperóxidos nos produtos das diferentes sínteses variam, de modo que a sua identificação e diferenciação permitem caracterizar uma determinada síntese e o ácido catalisador. De facto, foram obtidos perfis espectrais semelhantes nas sínteses 1 e 4 (HCl como catalisador), mas diferentes dos demais. Os perfis espectrais da síntese 2 (ácido muriático) e 3 (ácido sulfúrico) são diferentes entre si.

Foi também efetuada a deteção de TATP em vestígios de impressões digitais. Para tal foram usadas uma impressão digital latente de controlo, e impressões digitais após o manuseio do TATP. Os espectros obtidos, bem como os iões característicos do explosivo TATP, são apresentados na Figura 5.20. A impressão digital de controlo mostra os picos mais intensos a m/z 279,159584 (100%), compatíveis com um composto de ftalato $[\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{O}_4]^+$ com um desvio de $-1,8$ ppm, e a m/z 214,09002 (74%), o que pode corresponder a um acetato com composição química $[\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4]^+$ com um desvio de $0,27$ ppm. A intensidade desses picos permanece elevada mesmo em vestígios de impressões digitais com resíduos de explosivos.

Como esperado, ainda existem outros picos correspondentes a substâncias endógenas e exógenas. De notar que apenas alguns dos iões observados são descritos como representativos da diversidade de espécies presentes na composição química do vestígio de impressão digital [32]. O pico a m/z 205,08633 corresponde a um aduto inibidor de acetilcolinesterase com a composição química $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO} + \text{K}]^+$ e um desvio de apenas $0,09$ ppm. O pico a m/z 289,21662 é compatível com a hormona esteróide endógena $[\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_2]^+$ com

um desvio de 1,4 ppm. Foi detetado o composto 17-hidroxiandrostando-3-glucuronido a m/z 523,23033 ($[C_{25}H_{40}O_9 + K]^+$, desvio -0,12 ppm).

A m/z 301,14151, um composto com composição química ($[C_{13}H_{26}KO_5]^+$, desvio 1,1 ppm) é compatível com um polímero. São observados ácidos gordos a m/z 271,26369, 309,18299 e 427,17288, podendo corresponder às fórmulas químicas $[C_{17}H_{34}O_2]^+$, $[C_{16}H_{30}O_3]^+$ e $[C_{19}H_{32}KO_8]^+$, respetivamente. Os picos a m/z 282,27961, 371,31614 e 393,29846 são compatíveis com os seguintes lípidos: $[C_{18}H_{36}NO]^+$ (SulfoHexCer d18: 1/22:0), $[C_{22}H_{43}O_4]^+$ (MG 19:1/0:0/0:0) e $[C_{22}H_{42}NO_4]^+$ (LPS 17:1/0:0) [318]. O íão a m/z 302,305 pode ser atribuído à esfinganina $[C_{18}H_{39}NO_2]^+$, desvio 0,02 ppm. Também foram detetados aminoácidos como a leucina, o ácido glutâmico e a cisteína.

Apesar da complexidade do espectro dermopapilar, foi possível detetar TATP nas duas amostras em que este explosivo foi manuseado. Os íões característicos da amostra de controlo foram mantidos nos espectros B e C (Figura 5.20). Além disso, foram observados íões cujo perfil tipifica o TATP obtido com ácido muriático como catalisador - espectro B. Um dos íões mais abundantes em paralelo com o íão a m/z 279 é o íão a m/z 517 (100%) que é atribuído a $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + K]^+$, seguindo-se os íões a m/z 496 (67%) $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + NH_4]^+$, 591 (59%) $[H(OOC(CH_3)_2)_7OOH + K]^+$, 570 (55%) $[H(OOC(CH_3)_2)_7OOH + NH_4]^+$, 644 (44%) $[H(OOC(CH_3)_2)_8OOH + NH_4]^+$, 665 (44%) $[H(OOC(CH_3)_2)_8OOH + K]^+$, 501 (43%) $[H(OOC(CH_3)_2)_6OOH + Na]^+$ e 443 (39%) $[H(OOC(CH_3)_2)_5OOH + K]^+$. Também foram detetados outros oligómeros destas séries com intensidades mais baixas. Enquanto no espectro da síntese 2 (Figura 5.17) os íões mais abundantes correspondem a adutos com sódio, no espectro B da Figura 5.20 os adutos de potássio e amónio prevalecem.

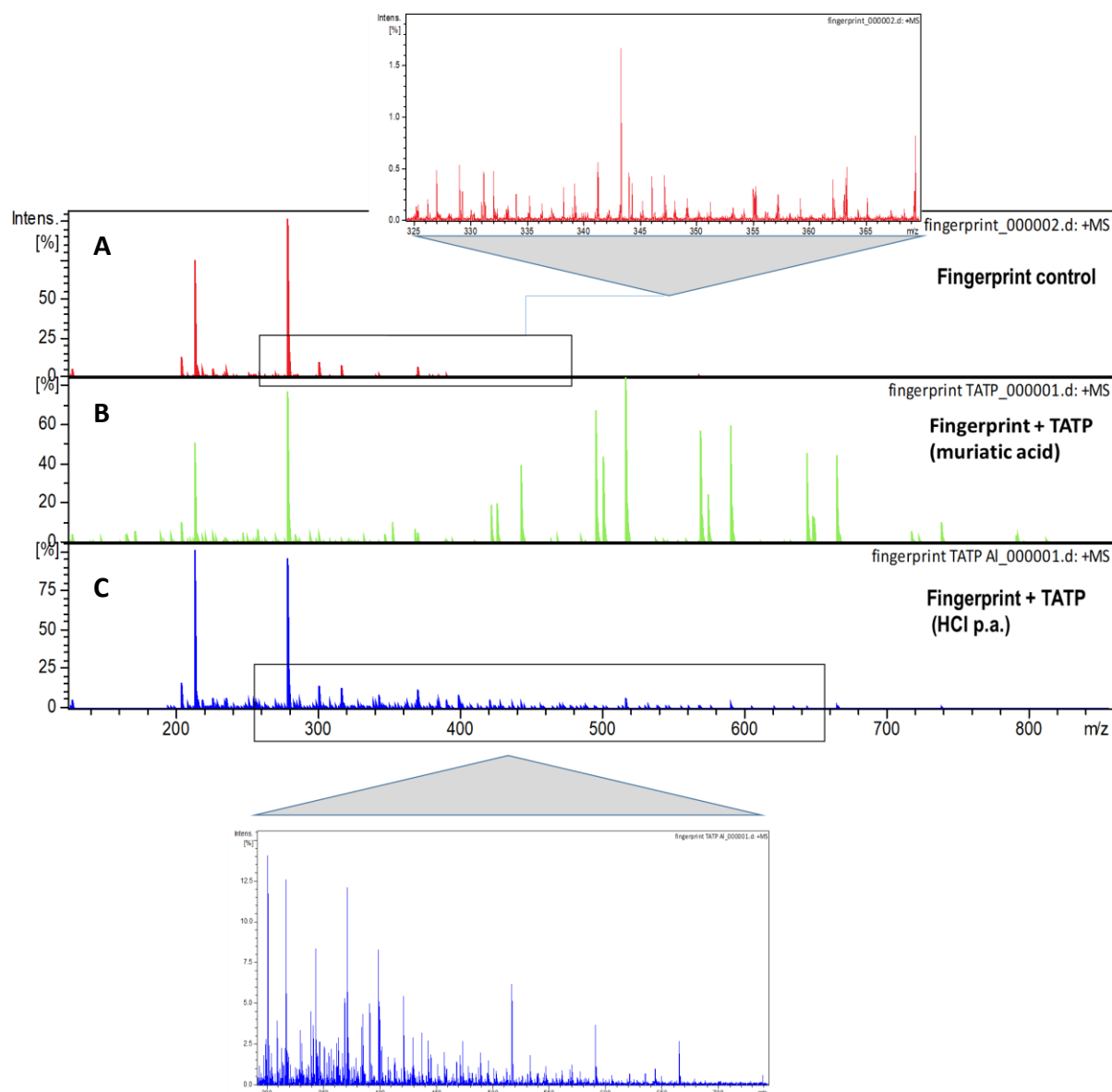


Figura 5.20 Espectro de massa ESI-FTICR do vestígio de impressão digital de controlo (A), vestígio de impressão digital com TATP produzido com ácido muriático como catalizador (síntese 2) (B) e vestígio de impressão digital com TATP produzido com HCl p.a. como catalizador (síntese 4) (C).

No espectro C, não se observou a presença de $[\text{TATP} + \text{Na}]^+$ como pico mais intenso, enquanto que a sua intensidade na síntese 4 foi de 100%. A presença do ácido fórmico nas soluções dos vestígios de impressões digitais promoveu a ionização do TATP, de modo que são observadas apenas as espécies químicas $[\text{TATP} + \text{Na}]^+$ e $[\text{TATP} + \text{O} + \text{Na}]^+$ características desta síntese, com baixas abundâncias relativas. Foi também verificada a presença de iões de todas as séries de oligómeros $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{Na}]^+ n = 3, n=5 \text{ a } 8$, $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{K}]^+ n$

= 4 a 9, $[\text{H}(\text{OOC}(\text{CH}_3)_2)_n\text{OOH} + \text{NH}_4]^+ n = 6$, $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n \text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{Na}]^+ n = 4$ e 5, $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n \text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{K}]^+ n=4$ e 5, e $[\text{H}(\text{O}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2)_n \text{OOC}(\text{O})\text{CH}_3 + \text{NH}_4]^+ n= 7$.

A ausência dos picos a m/z 487 e 503 sugere uma similaridade com os resultados obtidos nas sínteses 1 e 4 em que o HCl foi utilizado, representando uma clara diferença em relação ao TATP produzido com o uso de ácido muriático como catalisador. Estas diferenças podem ser detectadas graças à extrema resolução obtida nestes espectros de massa, impossível de observar em qualquer outro espectrómetro de massa por injeção directa.

5.3 ORBITRAP

Neste sub-capítulo serão abordadas as experiências realizadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa Orbitrap. Descrevem-se em primeiro lugar os materiais e instrumentação utilizados, bem como os parâmetros de análise. A quimiometria, neste sub-capítulo, é amplamente utilizada. Para a interpretação dos resultados utilizaram-se estatística descritiva, PCA, PLS, análise hierárquica de clusters e ANOVA.

5.3.1 Materiais

Foram usados os seguintes materiais: água (Milli-Q), metanol, acetonitrilo, acetato de amónio e ácido fórmico (LC-MS *grade*) e papel de alumínio.

5.3.2 Instrumentação e parâmetros de análise

As análises por LC-MS foram efetuadas com recurso a um Orbitrap Q-Exactive Focus (Thermofisher Scientific) acoplado a um UHPLC Dionex Ultimate 3000, existente no Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária. Foram realizadas inúmeras optimizações de forma a seleccionar a melhor metodologia de análise, que consistiram na variação de solventes, pH, coluna cromatográfica, entre outros. Para este estudo a separação cromatográfica foi efetuada através de uma coluna Accucore™ HILIC, com 10 cm de comprimento, 2,1 mm de diâmetro e com partículas de 2,6 µm de diâmetro a uma temperatura de 40 °C. Os dados analisados foram obtidos através de 3 sistemas cromatográficos:

5 Procedimento Experimental

- Sistema 1: sistema isocrático: ACN/100mM de acetato de amónio ajustado a pH 3 com ácido fórmico (70:30), com um fluxo de 0,4 ml/min durante 3 minutos.
- Sistema 2: sistema isocrático: ACN/100mM de acetato de amónio ajustado a pH 3 com ácido fórmico (70:30), com um fluxo de 0,4 ml/min durante 15 minutos.
- Sistema 3: sistema de gradiente: 100% de ACN durante 2 minutos. Dos 2 aos 40 minutos, gradiente até 70% ACN/30% de acetato de amónio ajustado a pH 3 com ácido fórmico. Esta proporção foi mantida durante mais 5 minutos.

A ionização foi efetuada por ESI (3,5 KV em modo positivo e -3,4 KV em modo negativo e com uma temperatura do capilar de 320 °C). Os espectros foram adquiridos nos modos positivo e negativo em *full scan* entre 70 a 800 m/z com uma resolução de 70000. Para uma maior identificação dos compostos, todos os iões foram submetidos ao processo dd-MS².

Como grupo de estudo foram analisadas amostras de 99 indivíduos, 46 do género feminino e 53 do género masculino, com idades compreendidas entre os 19 e os 63 anos – ver Figura 5.21.

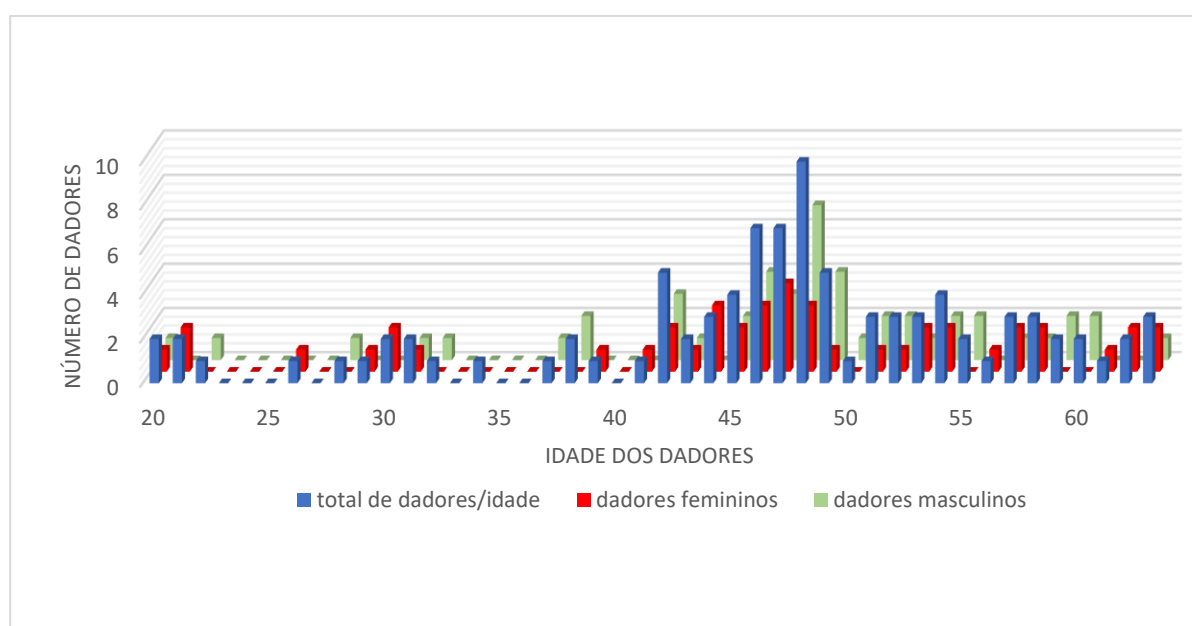


Figura 5.21 Gráfico representativo da população de estudo.

Para a criação de um modelo de classificação com mais fatores foi também estudada a idade dos dadores dos vestígios em conjunto com o género. Os vestígios em estudo foram catalogados em 9 grupos distintos: G1 (18-25 anos), G2 (26-30 anos), G3 (31-35 anos), G4 (36-40 anos), G5 (41-45 anos), G6 (46-50 anos), G7 (51-55 anos), G8 (56-60 anos) e G9 (61-65 anos), bem

como Feminino e Masculino para cada um dos grupos. Descrevem-se na Tabela 5.4 as idades da população de estudo e a mediana para cada um dos grupos.

Tabela 5.14 Descrição da população de estudo.

Faixa etária	Género	Idades da população de estudo	Mediana
G1 (18-25)	F	{20,21,21}	21
	M	{19,19,20,22}	20
G2 (26-30)	F	{26, 29,30, 30}	30
	M	{28}	28
G3 (31-35)	F	{31}	31
	M	{31, 32}	32
G4 (36-40)	F	{39}	39
	M	{37, 38, 38}	38
G5 (41-45)	F	{41,42,42,43,44,44,44,45,45}	44
	M	{42,42,42,43,45,45}	43
G6 (46-50)	F	{46,46,46,47,47,47,47,48,48,48,49}	47
	M	{46,46,46,46,47,47,47,48,48,48,48,48,48,49,49,49,50}	48
G7 (51-55)	F	{51,52,53,53,54,54}	53
	M	{51,51,52,52,53,54,54,55,55}	53
G8 (56-60)	F	{56,57,57,58,58}	57
	M	{57,58,59,59,60,60}	59
G9 (61-65)	F	{61,62,62,63,63}	62
	M	{63}	63

As impressões digitais foram apostas em papel de alumínio, por contacto direto da mão e dedos de cada indivíduo em estudo, sem qualquer tipo de preparação prévia, no sentido de simular as condições reais de aposição de impressões digitais. Estas impressões são extraídas da superfície de suporte (papel de alumínio) com 30 µl de solução metanol/água (2:1), e colocadas num *vial* (contendo uma solução de 70 µl metanol com ácido fórmico 4% (v/v)) sendo posteriormente guardadas durante 24 horas (no máximo) a uma temperatura de 4 °C. Desta forma, os vestígios dermopapilares estão prontos a ser analisados, sendo que terá de haver o cuidado de deixar o *vial* atingir a temperatura ambiente, antes do mesmo ser colocado no *autosampler* do cromatógrafo. Caso as amostras não sejam analisadas dentro das referidas 24 horas, deverão ser colocadas no congelador a -18 °C para que se preservem as características dos vestígios.

Os espectros foram calibrados externamente, com soluções calibrantes da Thermofisher para os modos positivo e negativo. Para o modo positivo foi usada a solução de calibração *Pierce LTQ ESI Positive Ion*, constituída por cafeína, Ultramark 1621 (mistura de fosfazinas fluorinadas), MRFA (Metionina, Arginina, Fenilalanina, Alanina), acetonitrilo, metanol, ácido acético e água. Para a calibração em modo negativo foi utilizada a solução *Pierce Negative Ion*,

constituída por dodecil sulfato de sódio, taurocolato de sódio, Ultramark 1621, acetonitrilo, metanol e ácido acético.

A análise de dados foi efetuada com recurso aos *softwares Xcalibur, Compound Discoverer 3.1*, e *Thermo Scientific Free Style*, todos da *ThermoFisher Scientific*. A análise dos resultados em termos comparativos e/ou de agrupamento foi realizada com *software* de análise estatística incorporado no *Compound Discoverer 3.1*, com recurso à análise descritiva, PCA, análise de *clustering*, DA-PLS e análise diferencial (ANOVA).

O pré-processamento de dados consistiu no alinhamento dos tempos de retenção, normalização das áreas dos picos com excepção das dos brancos através de um algoritmo do tipo *Constant Median*, imputação dos valores em falta com uma tolerância de 5 ppm através do algoritmo *Parameterless Peak Detection* (PPD) e deteção dos componentes constituintes das amostras em branco. Antes da análise diferencial, os valores das áreas sofreram uma transformação logarítmica de base 10 (Log10) de forma a estabilizar variações entre grupos.

5.3.3 Resultados e Discussão

Nas análises efetuadas foram obtidos cromatogramas e espectros de massa de grande complexidade, onde foi possível diferenciar 13.523 picos individuais de m/z , os quais foram utilizados para identificar compostos com vista à caracterização deste tipo de vestígio, bem como ao seu agrupamento e diferenciação em termos de género e idade do dador. Mostram-se nas Figuras 5.22, 5.23 e 5.25, a título exemplificativo, cromatogramas e espectros de massa obtidos para 3 dos dadores em estudo, nos 3 sistemas cromatográficos utilizados. O tempo de cromatografia melhora a separação cromatográfica e a identificação das diferentes espécies por MS^2 , pelo que também foram utilizados sistemas com tempos de corrida de 15 e 45 minutos. Nesta fase do estudo, o sistema cromatográfico 3 apenas foi utilizado para confirmação de algumas espécies químicas.

5 Procedimento Experimental

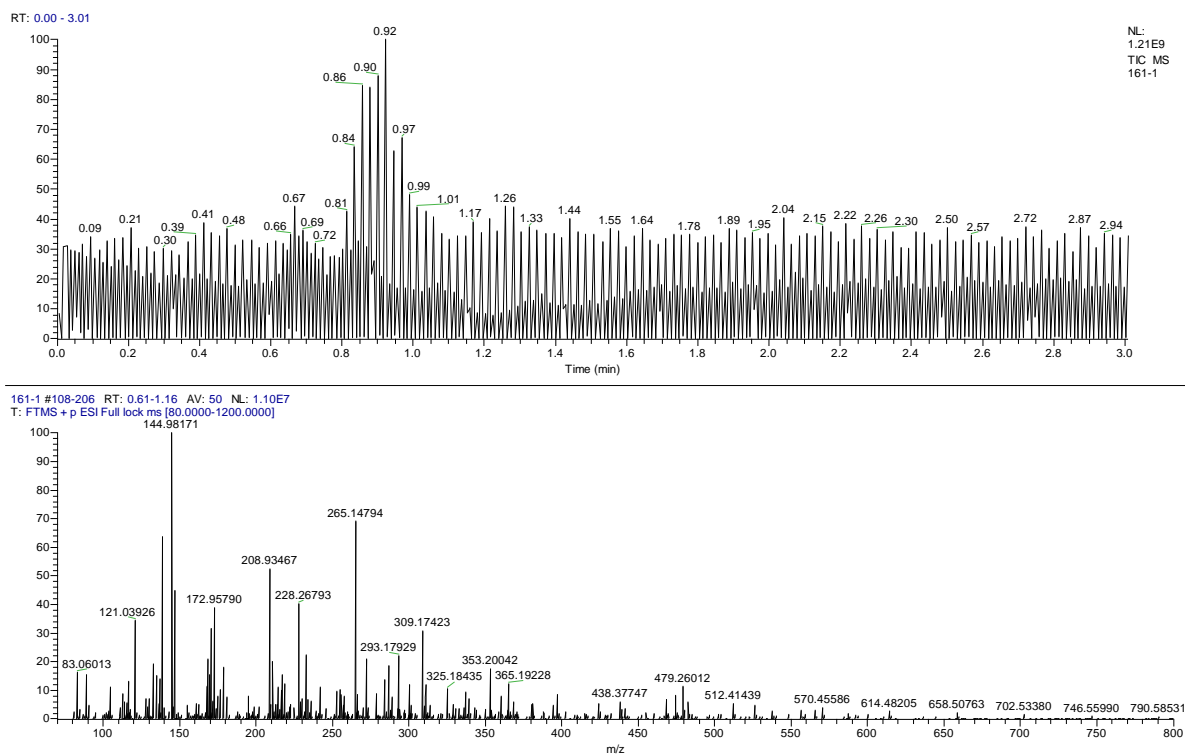


Figura 5.22 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género feminino de 53 anos, no intervalo de tempos de retenção de 0,61 a 1,61min.— Sistema 1.

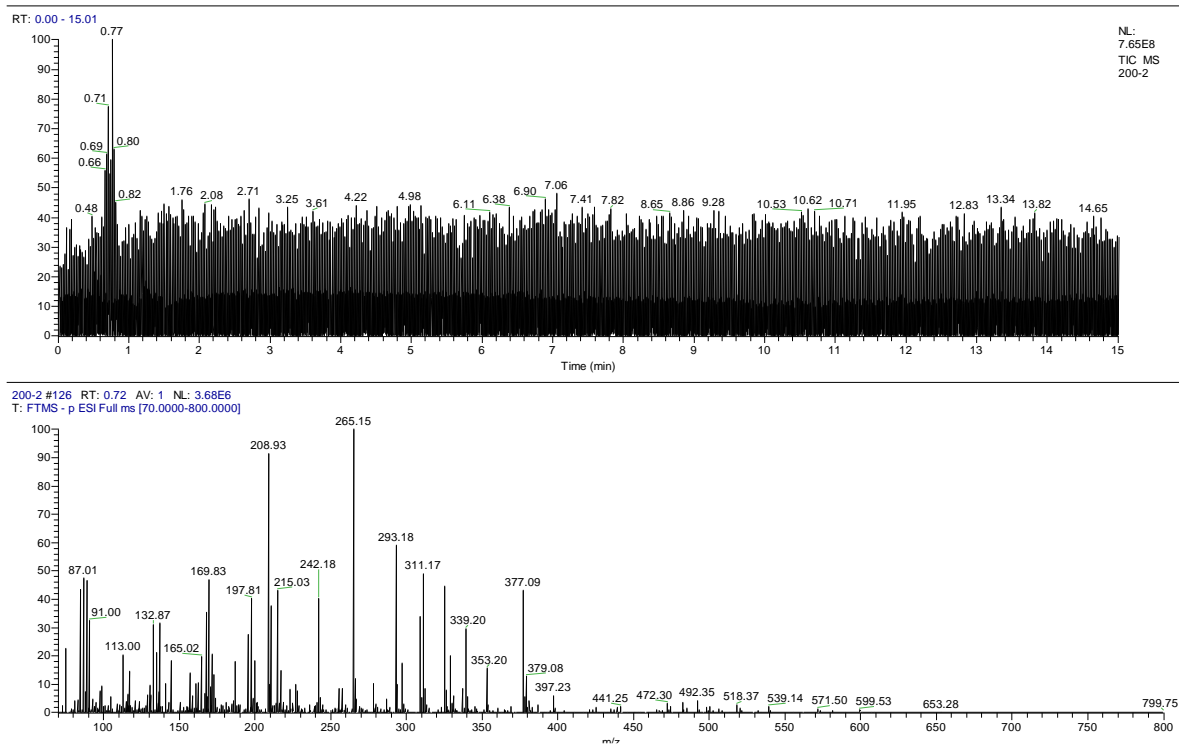


Figura 5.23 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género masculino de 19 anos para o tempo de retenção de 0,72 min. — Sistema 2.

5 Procedimento Experimental

Os sistemas cromatográficos 1 e 2 são muito semelhantes entre si, obtendo-se um maior número de identificações com o sistema 2. A Figura 5.24 ilustra o número de espécies químicas detetadas de acordo com a sua massa molecular.

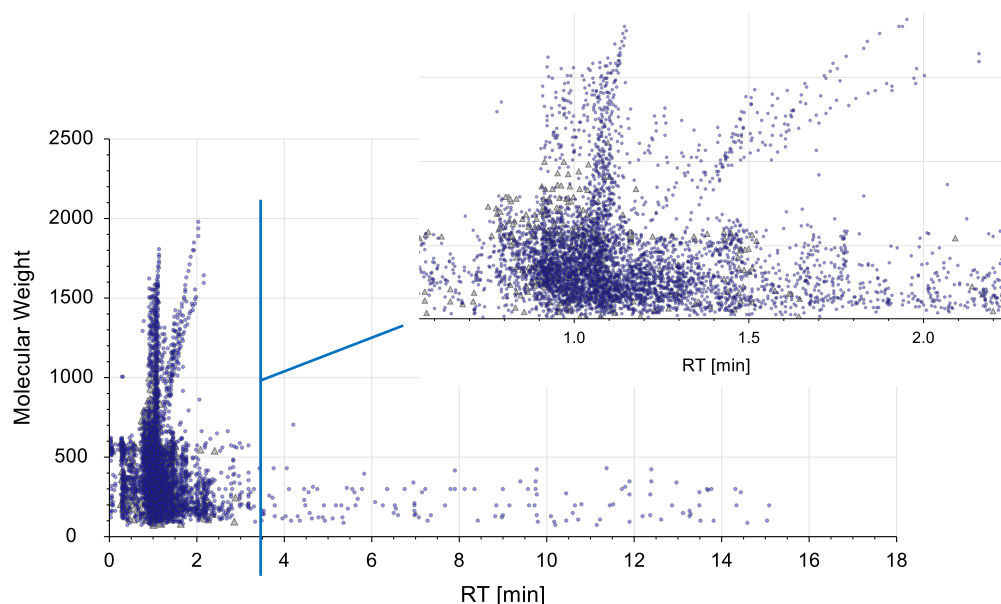


Figura 5.24 Gráfico representativo do número de espécies detetadas no sistema cromatográfico 2.

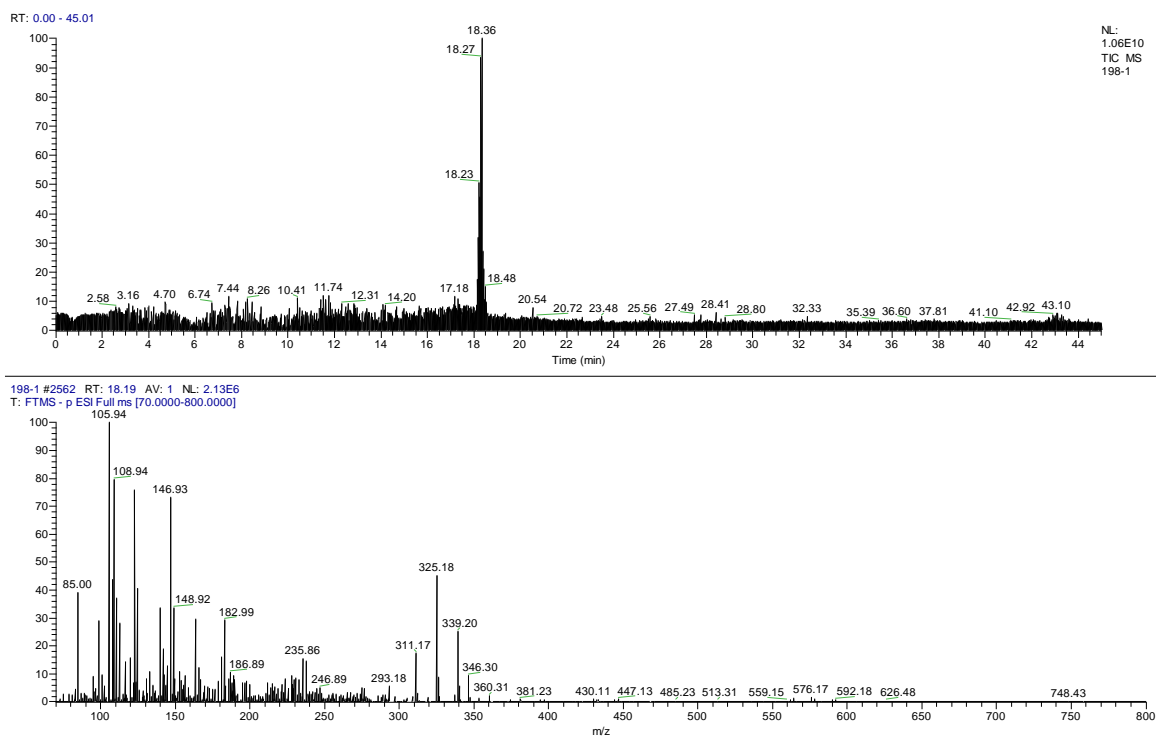


Figura 5.25 Cromatograma e espectro de massa do vestígio dermopapilar de um dador do género feminino de 21 anos para o tempo de retenção de 18,19 min. – Sistema 3.

Com o sistema 3 obteve-se um maior número de espécies químicas, como ilustra a Figura 5.26.

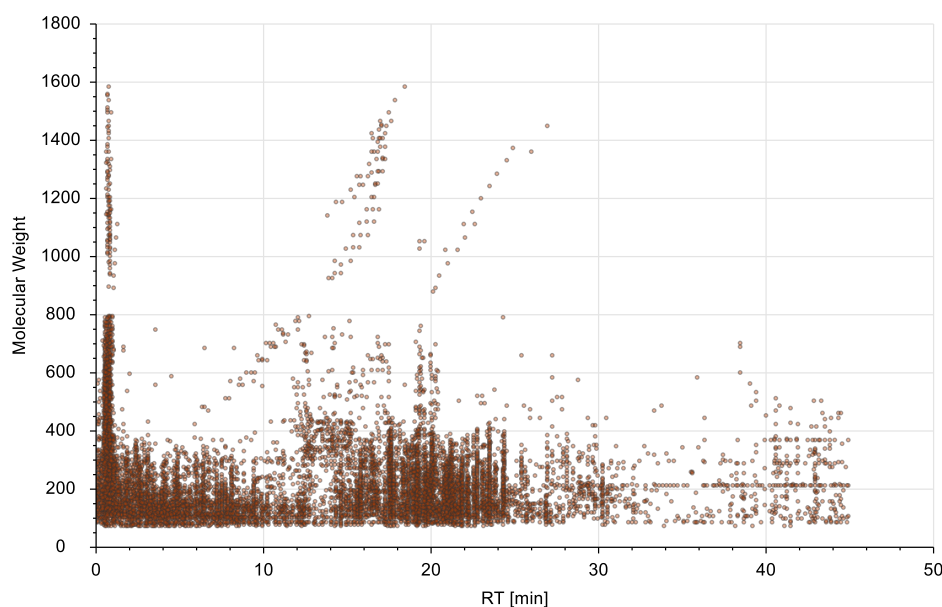


Figura 5.26 Gráfico representativo do número de espécies detetadas no sistema cromatográfico 3.

Estes sistemas cromatográficos foram realizados numa coluna HILIC. A cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC) fornece uma abordagem alternativa para separar efetivamente pequenos compostos polares em fases estacionárias polares [319]. A cromatografia líquida normal ou de fase reversa pode ser usada para análise. Na cromatografia líquida de fase normal (NP-LC), a fase estacionária é mais polar do que a fase móvel. A retenção aumenta à medida que a polaridade da fase móvel diminui e, portanto, os analitos polares são mais fortemente retidos do que os não polares. A situação oposta ocorre na cromatografia líquida de fase reversa (RP-LC). A NP-LC tem sido amplamente utilizada para separar vários compostos, de compostos não polares a altamente polares. Embora os sistemas RP-LC tenham sido usados anteriormente em LC-MS, nomeadamente devido à compatibilidade das fases móveis com o ESI, atualmente os métodos NP-LC estão a renascer. Tal como a NP-LC, a HILIC utiliza fases estacionárias polares tradicionais, como sílica, amino ou ciano, mas a fase móvel usada é semelhante àquelas utilizadas no modo RP-LC [320]. A HILIC também permite a análise de substâncias carregadas, como na cromatografia iónica (IC). A HILIC possui muitas vantagens específicas sobre a NP-LC e a RP-LC convencionais. As amostras polares mostram sempre boa solubilidade na fase móvel aquosa usada na HILIC, o que supera os inconvenientes da baixa solubilidade frequentemente encontrada na NP-LC. Reagentes de par-ião não são necessários na HILIC e os que são utilizados podem ser convenientemente acoplados à espectrometria de massa, especialmente no modo de ionização por ESI. Ao contrário da RP-LC, o gradiente de

eluição da HILIC começa com um solvente orgânico, usualmente o acetonitrilo, e elui os analitos polares. A Figura 5.27 ilustra em termos gerais os mecanismos de interação da coluna HILIC.

Os analitos polares ficam preferencialmente na camada rica em água e são retidos através de uma complexa combinação de: partição hidrofílica do analito entre a camada rica em água e a maior parte da fase móvel, ligação de hidrogénio entre os grupos funcionais polares e a fase estacionária, e interações eletrostáticas nos grupos funcionais ionizados. Sob condições experimentais específicas, podem estar presentes interações de Van der Waals entre a parte hidrofóbica dos ligantes da fase estacionária e a parte não polar dos analitos.

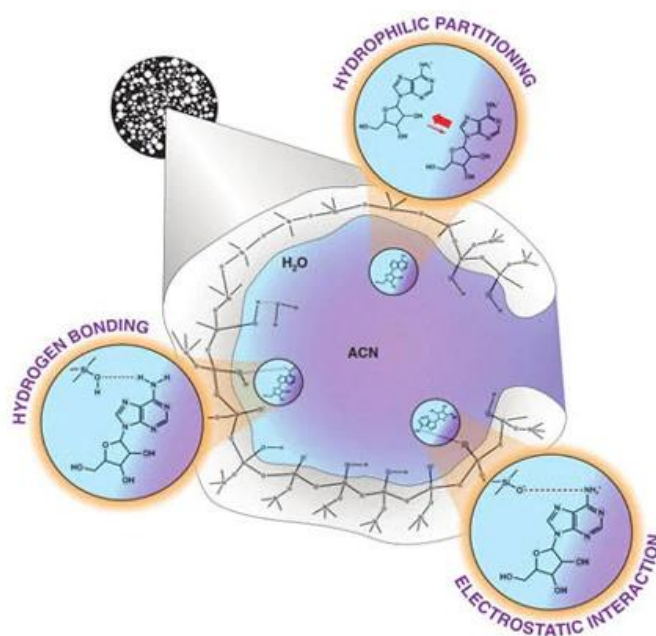


Figura 5.27 Mecanismos de retenção da coluna HILIC (*Thermoscientific.com*).

O uso da HILIC é uma vantagem na espectrometria de massa com ionização por ESI, uma vez que a fase móvel orgânica assegura uma dessolvatação eficiente que conduz a baixos limites de deteção. Foram realizados estudos metabolómicos baseados em HILIC-MS/MS [321],[322].

Para a análise dos resultados obtidos neste estudo foi utilizada uma metodologia de *Untarget workflow* que engloba 3 passos: *profiling*, identificação dos compostos e interpretação. A análise de perfil consiste (1) na preparação de amostras e aquisição de dados; (2) separação e

deteção de metabolitos; (3) remoção do ruído de fundo; (4) correção da linha de base; (5) normalização dos picos; (6) localização dos metabolitos e (7) análise estatística.

As amostras de metabolismo são tipicamente complexas e existem múltiplas interações entre metabolitos em estados biológicos. Para detetar eventos significativos, as plataformas de análise estatística univariada e multivariada (métodos quimiométricos) usam ferramentas de visualização para avaliar as relações de abundância entre os diferentes componentes.

Os métodos univariados são a abordagem estatística mais comum e analisam as características dos compostos de metabolitos de forma independente. Ao avaliar as diferenças entre dois ou mais grupos, geralmente são utilizados testes paramétricos, como o teste t de *Student* e a ANOVA (análise de variância).

Os resultados obtidos da análise de perfil (*profiling*) foram pesquisados nas seguintes bases de dados: m/z *Vault*, m/z *Cloud*, HMDB, *ChemSpider*, *Bamba Lab 34 Lipid Mediators*, *Bamba Lab 598 Polar Metabolites*, KEGG, bem como em *mass lists* incorporadas no sistema, *Toxicology and Drugs*, e *doping*, a título exemplificativo. Para confirmação da identificação utilizou-se o modo dd-MS² que consiste na execução de espectros de massa MS² em todos os picos detetados. A interpretação dos dados foi efetuada com base nas ferramentas estatísticas disponíveis no software CD 3.1.

Os sistemas 1 e 2 foram utilizados em 285 vestígios de 99 indivíduos. Pelo gráfico representado na Figura 5.28 podemos constatar a intra- e inter-variabilidade das amostras dos vestígios analisados neste estudo. Os pontos a negro indicam os compostos cujas áreas cromatográficas são menores ou maiores do que os limites do diagrama de caixa.

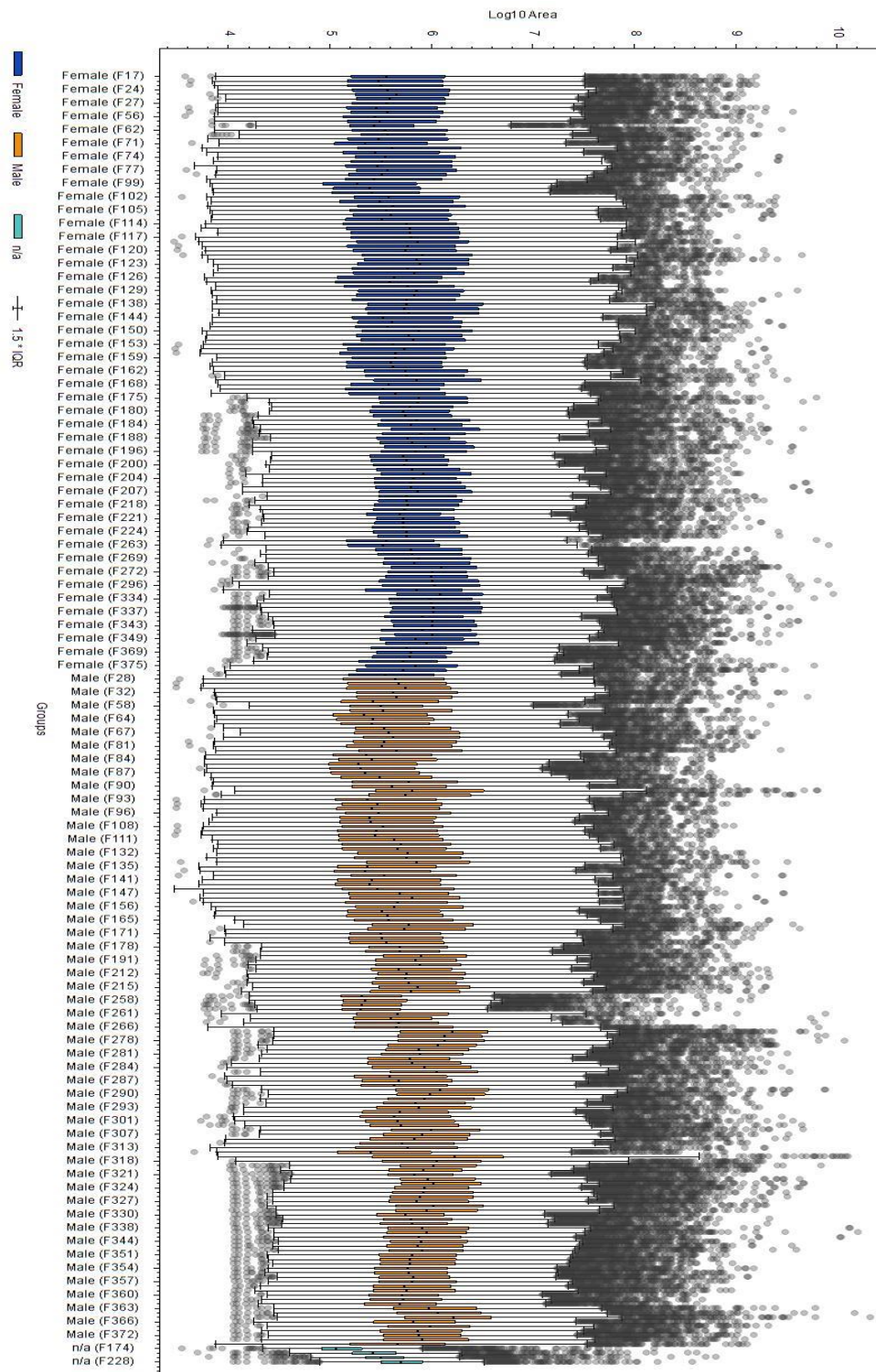


Figura 5.28 Diagramas de caixa de cada uma das amostras em estudo.

Este gráfico é uma análise descritiva que representa os dados observados de uma variável numérica através de quartis, onde o eixo horizontal representa a mediana [323] – ver Figura 5.29.

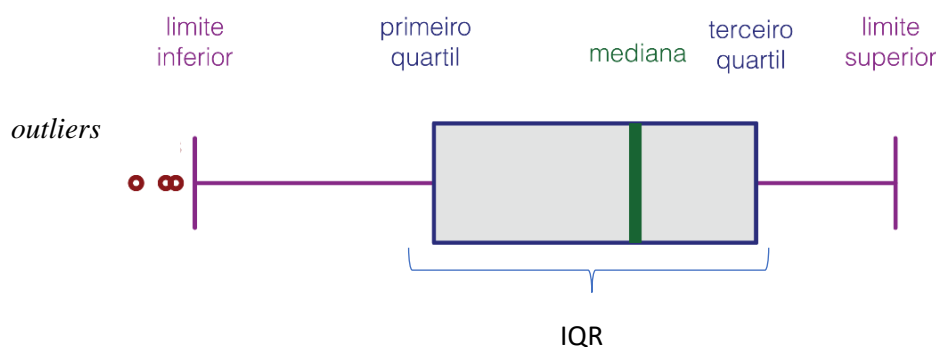


Figura 5.29 Representação de um diagrama de caixa.

A altura da caixa (*Interquartil range* - IQR) é calculada da seguinte forma: $IQR = \text{terceiro quartil (Q3)} - \text{primeiro quartil (Q1)}$, onde o limite superior é dado por $Q3 + IQR \times 1,5$ e o limite inferior por $Q1 - IQR \times 1,5$. A linha que se estende na vertical ou horizontal a partir da caixa, indica a variabilidade fora do quartil superior e do quartil inferior. Os valores *outliers* são representados fora do diagrama. O diagrama de caixa não é paramétrico, apresenta apenas a variação das amostras de uma população estatística. Este diagrama identifica onde estão localizados 50% dos valores mais prováveis, a mediana e os valores extremos.

5.3.3.1 Metabolómica

Metabolómica é o estudo de pequenos metabolitos presentes no interior de organismos, biofluidos, células ou tecidos. Da mesma forma, metabolito pode ser definido como um conjunto de pequenas moléculas não poliméricas com uma massa inferior a 1.000 Da, que estão envolvidas em reações metabólicas e são biossintetizadas por células, tecidos ou organismos [324]. A espectrometria de massa é bastante utilizada na análise metabolómica e até 2005 só podia ser realizada por FT-ICR. Marshall mostrou ser possível observar 11.000 compostos numa única amostra [196]. Entretanto, com a necessidade de quantificação e o surgimento de outras tecnologias, a LC-MS tornou-se a técnica mais usada para este tipo de abordagem. De uma forma geral, a espectrometria de massa é geralmente precedida por uma separação cromatográfica para quantificação e identificação dos metabolitos extraídos de matrizes complexas, com o objectivo de reduzir a supressão de ionização na espectrometria de massa, bem como permitir a separação de isómeros e compostos isobáricos. Estudos de metabolómica são de extrema importância em processos de investigação de novos medicamentos, na

descoberta de biomarcadores para determinadas doenças e por conseguinte ter um papel de diagnóstico para estas, entre outras. Neste projeto, o estudo metabolômico irá conduzir a uma caracterização dos metabolitos libertados pelas diversas segregações dermopapilares das impressões digitais com vista a determinar biomarcadores para a diferenciação de género e idade dos dadores de impressões digitais latentes.

Através da aplicação de um *workflow* para *Untargeted metabolomics* constante do *software Compound Discoverer 3.1* foram detetados 449 metabolitos. As Tabelas 5.15 e 5.16 listam alguns dos metabolitos detetados com um desvio inferior a 1,5 ppm. Os cerca de 60 metabolitos destas tabelas constam da *The Human Metabolome Database* – HMDB e podem ter diferentes proveniências: endógena, alimentação e/ou cosméticos/produtos de higiene.

Tabela 5.15 Listagem de iões positivos detetados nas impressões digitais latentes em estudo.

m/z experimental	Desvio (ppm)	Fórmula química	Identificação putativa	MS ²	Proveniência*
74,06000	1,26	[C ₃ H ₈ NO] ⁺	aminoacetona	✓	E, A
75,04400	1,15	[C ₃ H ₇ O ₂] ⁺	lactaldeído	—	E
90,09129	0,80	[C ₄ H ₁₂ NO] ⁺	N-dimetiletanolamina	✓	E, A, C
102,05479	0,99	[C ₄ H ₈ NO ₂] ⁺	ácido carboxílico 1-aminociclopropano	✓	A
104,07061	0,09	[C ₄ H ₁₀ NO ₂] ⁺	ácido DL-aminobutírico	✓	E, A
112,08692	-0,14	[C ₅ H ₁₀ N ₃] ⁺	histamina	✓	E, A
116,07061	-0,09	[C ₅ H ₁₀ NO ₂] ⁺	prolina	✓	E, A
118,08609	-1,26	[C ₅ H ₁₂ NO ₂] ⁺	valina	✓	A, C
123,05524	0,37	[C ₆ H ₇ N ₂ O] ⁺	nicotinamida	—	E, A, C
130,08591	1,42	[C ₆ H ₁₂ NO ₂] ⁺	ácido pipecólico	✓	E, A
138,08141	1,28	[C ₃ H ₈ NO ₂ +ACN] ⁺	alanina	—	E, A, C
133,09703	0,82	[C ₅ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺	ornitina	✓	E, A
138,05482	0,90	[C ₇ H ₈ NO ₂] ⁺	trigonelina	✓	E, A
139,05008	1,04	[C ₈ H ₉ O+NH ₄] ⁺	4-metilbenzaldeído	✓	E, A
147,07629	0,96	[C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₃] ⁺	ácido ureidoisobutírico	✓	E, A
147,11267	1,04	[C ₆ H ₁₅ N ₂ O] ⁺	lisina	✓	E, C
150,09131	1,10	[C ₈ H ₈ N+MeOH] ⁺	indole	—	E, A
152,05659	0,57	[C ₅ H ₆ N ₅ O] ⁺	guanina	✓	E, A
156,07668	0,40	[C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺	histidina	—	A, C
160,09671	0,69	[C ₇ H ₁₄ NO ₃] ⁺	5-acetoamidovalerato	—	E, A
162,11249	0,54	[C ₇ H ₁₆ NO ₃] ⁺	carnitina	✓	E, A, C
164,12799	0,75	[C ₆ H ₁₄ NO ₂ +MeOH] ⁺	leucina	✓	A, C
166,08617	0,77	[C ₉ H ₁₂ NO ₂] ⁺	fenilalanina	✓	A, C
175,11877	0,85	[C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂] ⁺	arginina	—	E, A, C
176,10280	0,89	[C ₆ H ₁₄ N ₃ O ₃] ⁺	citrulina	✓	E, A
182,08102	0,82	[C ₉ H ₁₂ NO ₃] ⁺	tirosina	✓	E, A, C
189,12326	0,58	[C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₃] ⁺	N6-acetil-L-lisina	—	E, A
289,21597	0,81	[C ₁₉ H ₂₉ O ₂] ⁺	testosterona	—	E, A
300,28928	-1,50	[C ₁₈ H ₃₈ NO ₂ +NH ₄] ⁺	ácido oleico	✓	E, A, C
302,30496	1,44	[C ₁₈ H ₄₀ NO ₂] ⁺	esfingalina	—	E, A
383,33081	0,17	[C ₂₇ H ₄₃ O] ⁺	7-dehidrodesmosterol	—	E, A
427,39331	0,31	[C ₃₀ H ₅₁ O] ⁺	(S)-2,3-epoxiesqualeno	—	E, A
443,38867	-0,49	[C ₃₀ H ₅₁ O ₂] ⁺	4α,14α-dimetil-24-metilen-colest-8-en-3β-ol	—	E, A

*(E) Endógena, (A) Alimentação, (C) Cosméticos/Produtos de higiene

Tabela 5.16 Listagem de íons negativos detetados nas impressões digitais latentes em estudo.

m/z experimental	Desvio (ppm)	Fórmula química	Identificação putativa	MS ²	Proveniência*
104,03517	1,39	[C ₃ H ₆ NO ₃] ⁻	serina	✓	E, A, C
113,02441	0,23	[C ₅ H ₅ O ₃] ⁻	cis-acetilacrilato	—	E
115,00365	0,30	[C ₄ H ₃ O ₄] ⁻	ácido fumárico	—	E, A
116,03532	0,00	[C ₄ H ₆ NO ₃] ⁻	aspartato semialdeído ou ácido L-2-amino-3-oxobutanóico	—	E, A
117,01929	-0,53	[C ₄ H ₅ O ₄] ⁻	DL-erythrono-1_4-lactona; erythrono-1,4-lactona	✓	E, A
121,02947	0,22	[C ₇ H ₅ O ₂] ⁻	4-hidroxibenzaldeído	—	E, A
124,00729	0,78	[C ₂ H ₆ NO ₃ S] ⁻	taurina	—	E, A
127,07639	0,50	[C ₇ H ₁₁ O ₂] ⁻	ácido ciclohexamino carboxílico	—	E, A
128,03517	0,62	[C ₅ H ₆ NO ₃] ⁻	1-pirrolina-4-hidroxi-2-carboxilato	✓	E
129,01936	-0,08	[C ₅ H ₅ O ₄] ⁻	ácido glutacónico	—	E, A
132,03018	0,08	[C ₄ H ₆ NO ₄] ⁻	aspartato	✓	E, A
137,02448	-0,27	[C ₇ H ₅ O ₃] ⁻	ácido salicílico	✓	A, C, M
137,03575	0,19	[C ₆ H ₅ N ₂ O ₂] ⁻	ácido urocânico	✓	E, A
145,05061	0,04	[C ₆ H ₉ O ₄] ⁻	ácido (S)-2-Aceto-2-hydroxibutanóico ou ácido adípico	✓	E, A
146,04593	-0,11	[C ₅ H ₈ NO ₄] ⁻	ácido glutâmico	✓	E, A
151,02615	-0,03	[C ₅ H ₃ N ₄ O ₂] ⁻	xantina	—	E, A
157,01421	0,46	[C ₆ H ₅ O ₅] ⁻	ácido acético maleil	✓	(?)
157,05055	0,54	[C ₇ H ₉ O ₄] ⁻	isopropilmaleato	✓	E, A
167,02097	0,76	[C ₅ H ₃ N ₄ O ₃] ⁻	ácido úrico	✓	E, A
170,04584	0,48	[C ₇ H ₈ NO ₄] ⁻	tetrahidrodipicolinato	✓	E
189,04042	-0,10	[C ₇ H ₉ O ₆] ⁻	3-deidroquinato	—	E, A
215,03294	-0,52	[C ₆ H ₁₁ O ₆ Cl] ⁻	1D-qui-ro-inositol	✓	E, A
255,23283	0,05	[C ₁₆ H ₃₁ O ₂] ⁻	ácido palmítico	—	E, A
263,12878	0,52	[C ₁₅ H ₁₉ O ₄] ⁻	ácido abscisíco	✓	E, A
279,23340	-1,00	[C ₁₈ H ₃₁ O ₂] ⁻	ácido linoleico	—	E, A, C
283,26419	0,01	[C ₁₈ H ₃₅ O ₂] ⁻	ácido octadecanóico	—	E, A
308,09885	-0,61	[C ₁₁ H ₁₈ NO ₉] ⁻	ácido N-acetilmuramínico	—	E, A
387,11456	0,24	[C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ +FA-H] ⁻	α,α, trehalose	✓	E, A

*(E) Endógena, (A) Alimentação, (C) Cosméticos/Produtos de higiene, (M) Metabolito microbiano

Os aminoácidos são uma classe de compostos presente em todos os sistemas biológicos. Os aminoácidos e seus derivados são biomarcadores comuns em processos fisiológicos humanos e os principais biomarcadores usados no diagnóstico de doenças neonatais [325].

Os aminoácidos que o ser humano não consegue sintetizar são denominados essenciais. Dos aminoácidos considerados essenciais, foram identificados sete: fenilalanina, histidina, lisina, isoleucina, leucina, valina e triptofano.

A fenilalanina (ácido (2S)-2-amino-3-fenilpropanóico) foi identificada sob a forma protonada [C₉H₁₂NO₂]⁺ (m/z 166,08617) cujo espectro MS² se apresenta na Figura 5.30. Neste espectro

observa-se a presença do produto de fragmentação $[C_8H_{10}N]^+$, m/z 120,08070 pela perda de $H_2O + CO$. Este ião é denominado de imônio e corresponde à fragmentação simultânea da posição amina e da posição terminal do carboxilo. O produto de fragmentação a m/z 103,05416 foi formado por perda de NH_3 . Os produtos de fragmentação a m/z 93,06990 e m/z 91,05415 foram formados pelas perdas sequenciais de HCN e H_2 do ião fragmento a m/z 120,08070. O pico mais abundante corresponde ao ião $[C_8H_7]^+$, m/z 103,05416. Outra via de fragmentação [326] é iniciada a partir da perda de NH_3 para formar um produto de fragmentação a m/z 149 (que não aparece no espectro de massa). Perdas de H_2O e CO a partir do ião deste fragmento resultaram na formação do produto de fragmentação a m/z 103,05416.

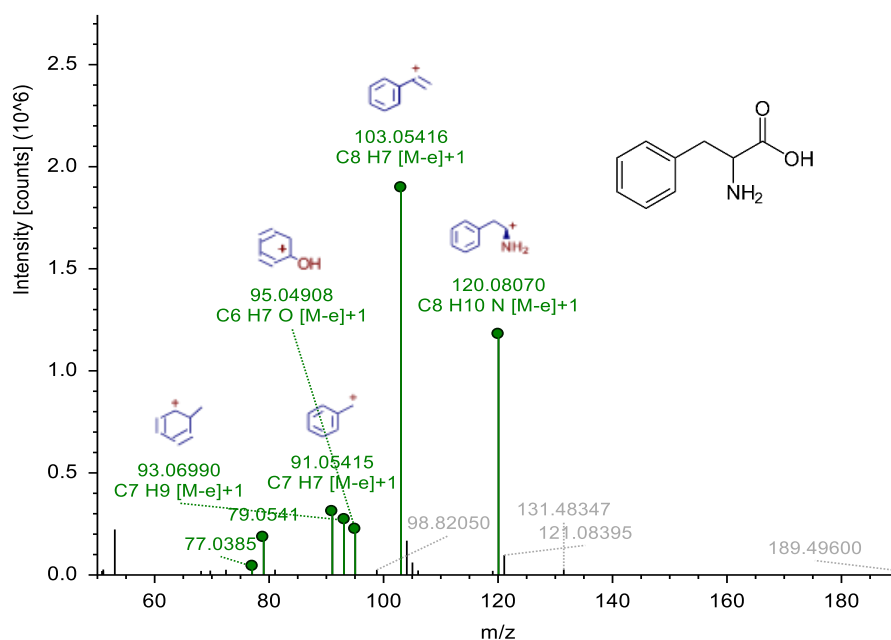


Figura 5.30 Espectro de massa MS^2 da fenilalanina.

Os mamíferos têm a capacidade de transformar a L-fenilalanina em L-tirosina (aminoácido não essencial) através da hidroxilação do anel aromático, onde se forma um intermediário óxido areno (Figura 5.31).

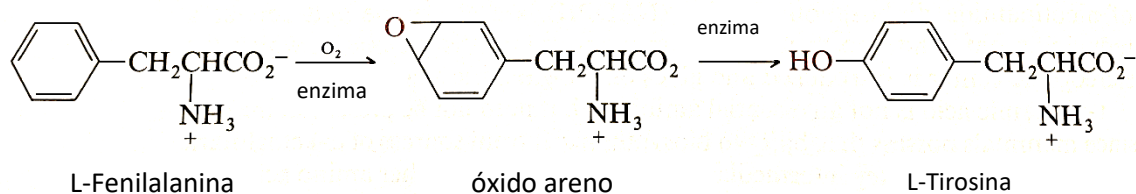


Figura 5.31 Reação de transformação da fenilalanina em tirosina, pela enzima fenilalanina hidroxilase [327].

A histidina (ácido (2S)-2-amino-3-(1H-imidazol-5-il)propanóico), $[C_6H_{10}N_3O_2]^+$ (m/z 156,07668), é um precursor da histamina $[C_5H_{10}N_3]^+$, m/z 112,08692. A sua formação ocorre através de uma reação de descarboxilação (Figura 5.32). A histamina é um vasodilatador presente nos tecidos, cuja quantidade aumenta após choque traumático e em situações alérgicas.

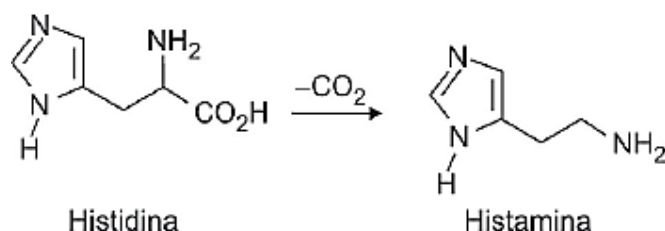


Figura 5.32 Reação de descarboxilação da histidina [327].

O ácido urocânico (ácido (2E)-3-(1H-imidazol-4-il)prop-2-enóico) $[C_6H_5N_2O_2]^-$, m/z 137,03575, também detetado em vestígios dermopapilares, é um intermediário no catabolismo da L-histidina e excretado através da transpiração. A L-lisina (ácido (2S)-2,6-diaminohexanóico) foi identificada através do ião $[C_6H_{15}N_2O_2]^+$, m/z 147,11267.

A leucina, isoleucina e valina são três aminoácidos de cadeia ramificada, como se pode observar na Figura 5.33.

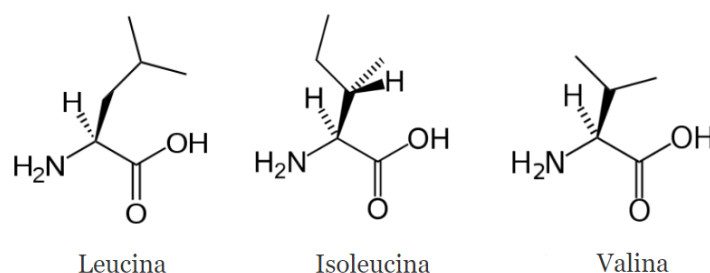


Figura 5.33 Aminoácidos de cadeia ramificada.

A isoleucina (ácido ((2S,3S)-2-amino-3-metilpentanóico) foi detetada sob a forma do ião positivo $[C_6H_{14}NO_2+MeOH]^+$, m/z 164,12799, cujo espectro de MS² se apresenta na Figura 5.34. Observa-se neste espectro o ião imónio $[C_5H_{12}N]^+$, m/z 86,09641 originado pela perda de ácido fórmico, CH_2O_2 . O produto de fragmentação a m/z 69,06985 foi proposto como característico da isoleucina, e portanto, um elemento diferenciador da leucina [328]. Porém, um

5 Procedimento Experimental

estudo mais recente concluiu que com energia de colisão suficiente, a leucina também origina o produto de fragmentação a m/z 69 [326]. Na matriz biológica utilizada no presente estudo, sob a mesma energia de colisão, também foi detetada leucina (sem o íon m/z 69 no seu padrão de fragmentação) – ver Figura 5.35.

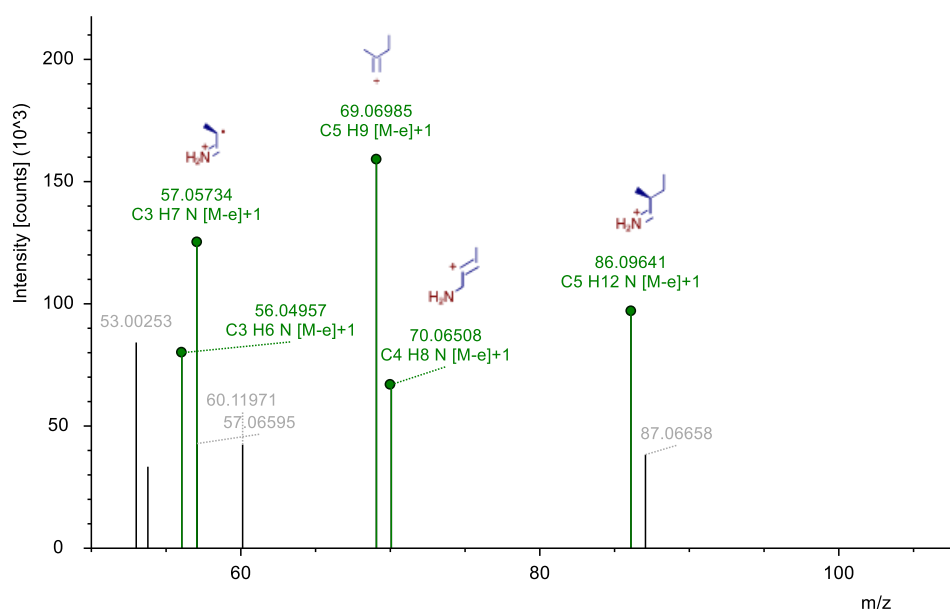


Figura 5.34 Espectro de massa MS² da isoleucina.

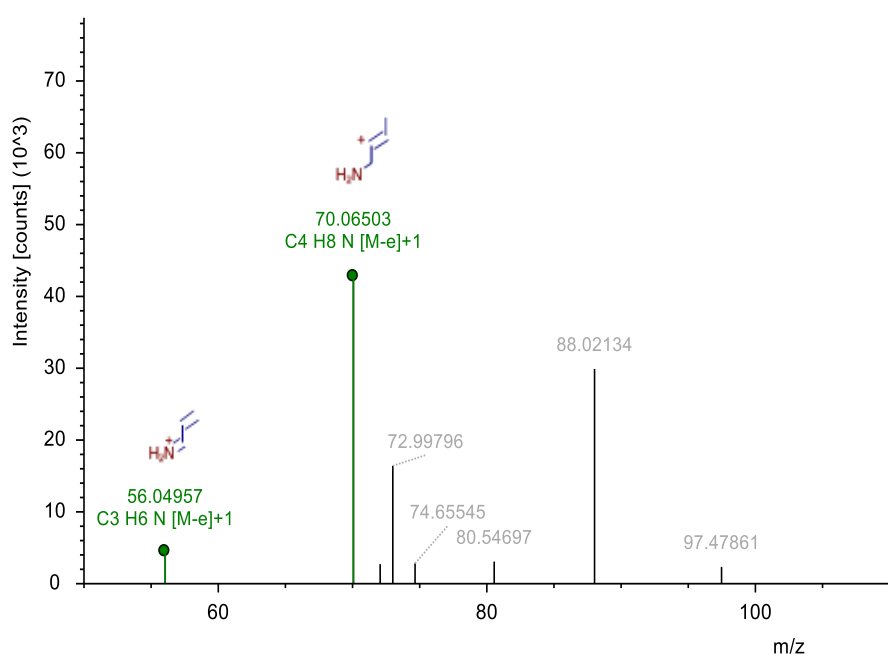


Figura 5.35 Espectro de massa MS² da leucina.

A valina (ácido (2S)-2-amino-3-metilbutanóico) foi detetada pela presença do ião $[C_5H_{12}NO_2]^+$, m/z 118,08609, cujo espectro de massa apresenta um produto de fragmentação a m/z 58,06533 $[C_3H_8N]^+$, que poderá corresponder à perda de NH_2+CO_2 . Contudo este espectro de massa não apresenta o típico ião imónio a m/z 72.

O triptofano (ácido (S)-2-Amino-3-(1H-indol-3-il)-propiónic) foi detetado sob a forma protonada $[C_{11}H_{12}N_2O_2]^+$, m/z 188,07034 com um desvio de -1,15 ppm. No espectro de massa MS^2 , ver Figura 5.36, observam-se os seguintes produtos de fragmentação: $[C_{11}H_8NO]^+$, m/z 170,05972; $[C_{10}H_{11}N_2]^+$, m/z 159,09161; $[C_9H_8NO]^+$, m/z 146,06003; $[C_9H_{10}N]^+$, m/z 132,08066; $[C_8H_8N]^+$, m/z 118,06503; $[C_9H_7]^+$, m/z 115,05417; $[C_8H_7]^+$, m/z 103,05438; $[C_7H_7]^+$, m/z 91,05409 e $[C_2H_4NO_2]^+$, m/z 74,02359. O ião $[C_{11}H_{12}N_2O_2]^+$, m/z 188,07034 origina o produto de fragmentação a m/z 170,05972 por perda de NH_2 , um produto de fragmentação com m/z 146,06003 e um produto de fragmentação menos abundante a m/z 144,08092. Estes foram formados após a perda adicional de CH_2CO e CO_2 , respectivamente. A perda de CH_2CO envolve uma migração hidroxilo intramolecular entre o grupo carboxílico para o carbono β . O ião $[C_9H_8NO]^+$ a m/z 146,06003 foi ainda dissociado para formar o produto de fragmentação predominante a m/z 118,06503 após a perda de CO . Finalmente, uma perda adicional de HCN resultou na formação do ião a m/z 91,05409. Por outro lado, o ião $[C_9H_7]^+$ a m/z 115,05417 foi formado após a perda sequencial de CO e HCN do ião $[C_{11}H_8NO]^+$, m/z 170,05972.

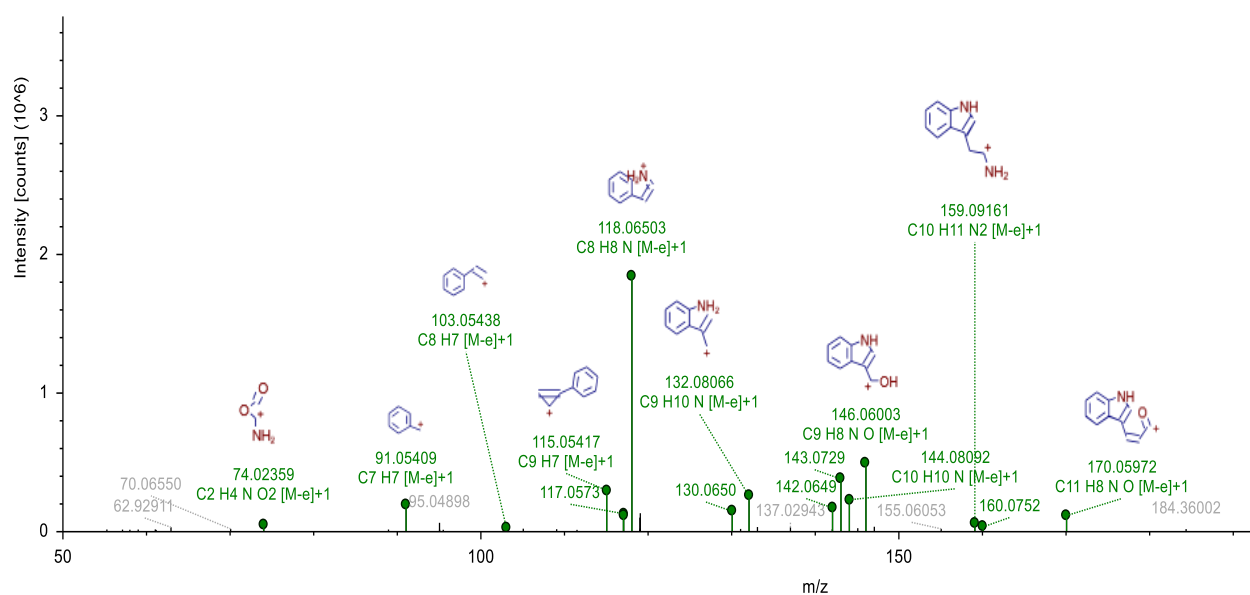


Figura 5.36 Espectro de massa MS^2 do triptofano.

Tal como estudado por Zhang e colaboradores [326], a fragmentação do triptofano protonado segue uma via principal e duas vias secundárias.

De realçar que todos estes aminoácidos são excretados através transpiração.

Foram também detetados 8 aminoácidos não essenciais: ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, prolina, serina, asparagina e tirosina. O ácido aspártico, conhecido como aspartato, (ácido (2S)-2-aminobutanodióico) $[\text{C}_4\text{H}_6\text{NO}_4]^-$, m/z 132,03018 é um neurotransmissor que promove a resistência à fadiga.

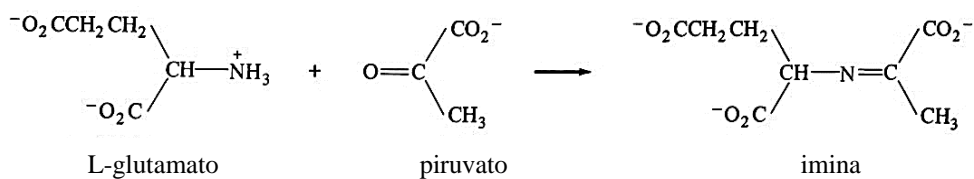
O ácido glutâmico (ácido (2S)-2-aminopentanedioico) foi detetado na forma de glutamato $[\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}_4]^-$, m/z 146,04593. Na maioria dos organismos este ácido forma-se a partir da amónia e do ácido α -cetoglutarico (um dos intermediários no ciclo de Krebs e que surge por via metabólica a partir das proteínas, hidratos de carbono e gorduras dos alimentos).

A amónia reage com o grupo carbonilo da cetona originando uma imina, sendo esta reduzida à função amina do α -aminoácido. Tanto a formação da imina como a sua redução são reações de catalisação enzimática. A forma reduzida da NADPH (difósforonucleotido nicotinamida) é uma coenzima que atua como agente redutor.

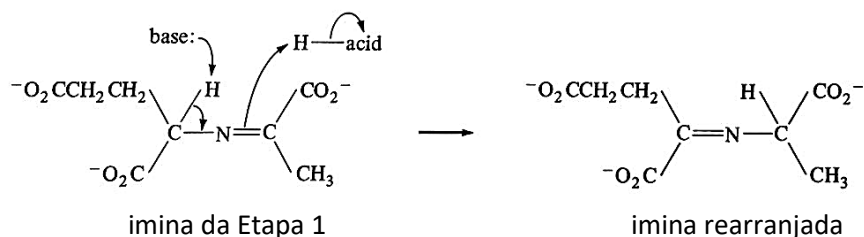
O ácido L-glutâmico não é um aminoácido essencial. Não necessita de ser introduzido no organismo pelos alimentos visto os mamíferos terem capacidade de o sintetizar a partir de fontes de ácido α -acetoglutarico. No entanto, é um intermediário na síntese de outros aminoácidos por um processo denominado transaminação. Por sua vez, a alanina (ácido (2S)-2-aminopropanóico) forma-se a partir do ácido pirúvico por transaminação do ácido L-glutâmico (Figura 5.37). Na transaminação um grupo amina é transferido do ácido L-glutâmico para o ácido pirúvico. Este aminoácido foi detetado nos vestígios analisados na forma adutada $[\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_2 + \text{ACN}]^+$, m/z 138,08141 e na forma protonada $[\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_2]^+$, m/z 90,05490.

5 Procedimento Experimental

Etapa 1: O grupo funcional amina do L-glutamato reage com o grupo carbonilo do piruvato para formar a imina.



Etapa 2: As etapas de transferência de prótons catalisadas por enzimas causam migração da dupla ligação, convertendo a imina formada na Etapa 1 numa imina isomérica.



Etapa 3: A hidrólise da imina rearranjada origina L-alanina e α -cetoglutarato.

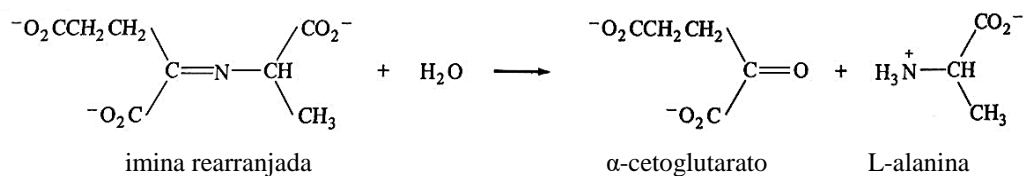


Figura 5.37 Transformação do L-glutamato em L-alanina [327].

A arginina (ácido (2S)-2-amino-5-carbamimidamidopentanóico) foi detetada sob a forma protonada $[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2]^+$, m/z 175,11877. O espectro de massa MS^2 deste aminácido apresenta fragmentos característicos, como se pode observar na Figura 5.38: $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_3]^+$, m/z 112,08694; $[\text{C}_4\text{H}_7\text{O}]^+$, m/z 71,04895; $[\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}]^+$, m/z 72,08064; $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 70,06503 e $[\text{CH}_6\text{N}_3]^+$, m/z 60,05570. Observam-se 4 vias de fragmentação. O ião $[\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2]^+$, m/z 175,11877 (arginina) perde NH_3+CO para dar origem ao ião $[\text{C}_5\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}]^+$ (m/z 130, não detetado), que por sua vez perde CH_5N_3 para dar origem ao produto de fragmentação detetado a m/z 71,04895. Numa outra via, o ião molecular perde $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2$ para dar origem ao produto de fragmentação a m/z 60,05570. Por uma terceira via, o ião molecular perde uma molécula de NH_3 para dar origem ao produto de fragmentação, não detetado neste estudo, $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2]^+$ (m/z 158). Este por sua

5 Procedimento Experimental

vez, por perda de $\text{H}_2\text{O}+\text{CO}$ dá origem ao produto de fragmentação a m/z 112,08694. Na última via de fragmentação visível neste espectro, o ião molecular perde CH_3N_3 para dar origem ao fragmento não detetado neste estudo $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ (m/z 116), que por perda de $\text{H}_2\text{O}+\text{CO}$ dá origem ao produto de fragmentação detetado a m/z 70,06503 e que por perda de CO_2 dá origem ao fragmento detetado a m/z 72,08064.

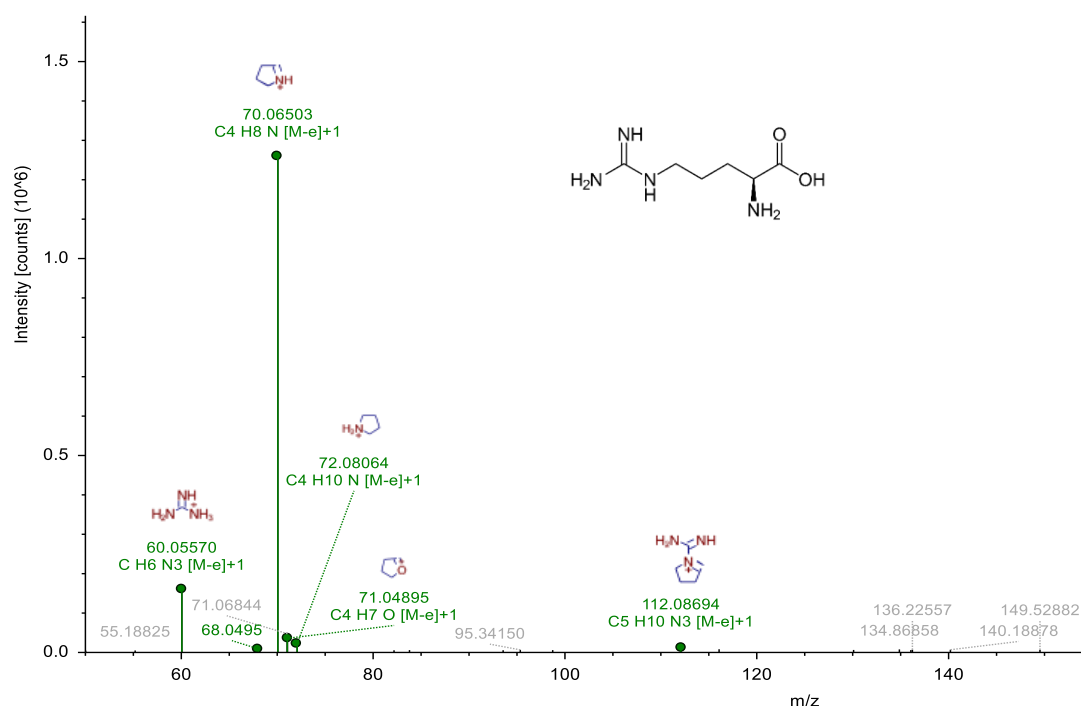


Figura 5.38 Espectro MS^2 da arginina.

O aminoácido prolina (ácido (2S)-pirrolidina-2-carboxílico) detetado a m/z 116,07061 sob a forma do ião $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ apresenta um espectro MS^2 representado na Figura 5.39. Observa-se o característico ião imónio $[\text{C}_4\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 70,06513 (perda de CH_2O_2). Em alguns dos vestígios dermopapilares verifica-se a presença do ião prolinamida $[\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}]^+$, m/z 115,08558, que deriva da L-prolina.

Na via metabólica da interconversão da arginina, ornitina e prolina foram identificados 10 compostos – ver, a título exemplificativo, Figura 5.40.

5 Procedimento Experimental

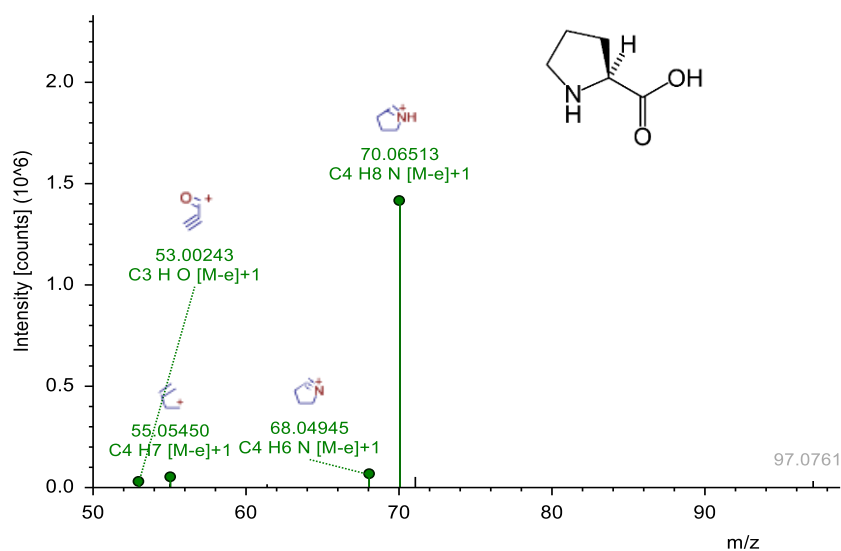


Figura 5.39 Espectro de massa MS² da prolina.

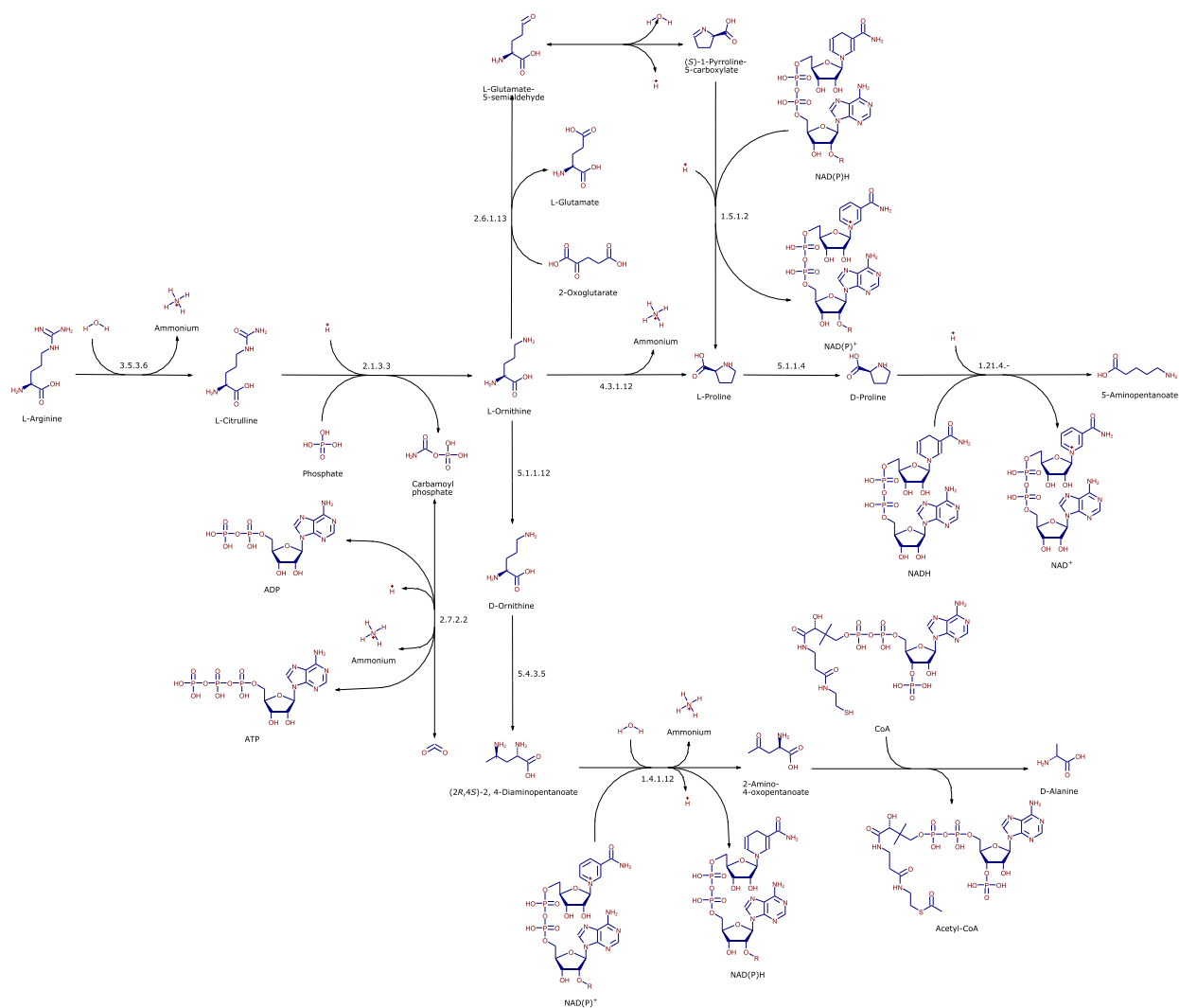


Figura 5.40 Via metabólica de interconversão da arginina, ornitina e prolina.

5 Procedimento Experimental

A serina (ácido (2S)-2-amino-3-hidroxiopropanóico) foi detetada sob a forma do ião $[C_3H_6NO_3]^-$ m/z 104,03517. Verifica-se também a presença do composto 2-metilserina sob a forma do ião negativo $[C_4H_9NO_3]^-$, m/z 120,06538 com um desvio de 0,73 ppm. A serina, por perda de uma molécula de água, dá origem ao piruvato e NH_4^+ , através da formação do intermediário aminoacrilato.

A tirosina (ácido (2S)-2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanóico) $[C_9H_{12}NO_3]^+$, m/z 182,08102 apresenta o espectro MS^2 representado na Figura 5.41. Este espectro apresenta como produtos de fragmentação característicos deste composto o $[C_8H_{10}NO]^+$, m/z 136, 07573 (perda de CH_2O_2), o $[C_7H_7O]^+$, m/z 107,04887 (perda de $C_2H_5NO_2$) e o $[C_2H_5NO_3]^+$, m/z 91,05415 (perda de $C_2H_5NO_3$). Este composto é precursor da biossíntese de neurotransmissores como se pode ver no esquema da Figura 5.42. Cada transformação é catalisada por uma enzima. A hidroxilação do anel aromático da tirosina converte-o em L-dopa (3,4-dihidroxifenilalanina) cuja descarboxilação origina a dopamina. A hidroxilação do carbono benzílico da dopamina converte-o em noradrenalina e a metilação do grupo amina da noradrenalina dá origem à adrenalina.

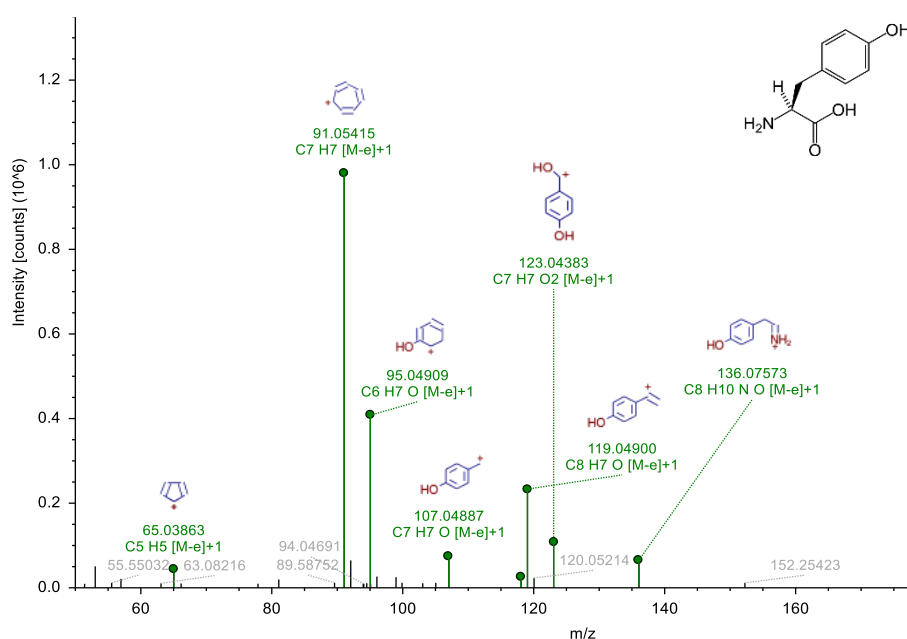


Figura 5.41 Espectro de massa MS² da tirosina.

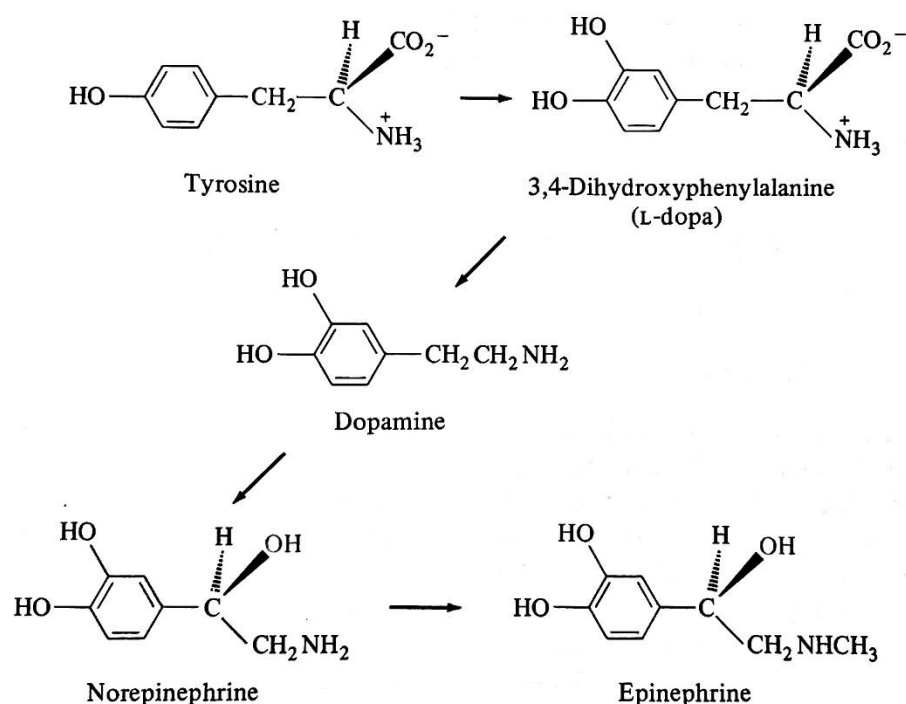


Figura 5.42 Biossíntese de neurotransmissores [327].

Foi também detetada a forma acetilada da glutamina, N-acetilglutamina (ácido (2S)-2-acetamido-5-amino-5-oxopentanóico), que é a forma acetilada do aminoácido L-glutamina, o precursor do glutamato. O ião $[C_7H_{13}N_2O_4]^+$ a m/z 189,08679 apresenta um desvio de -0,96 ppm. Em modo positivo foram detetados os iões adutos com sódio e potássio: $[C_7H_{12}N_2O_4Na]^+$ (m/z 211,06865) e $[C_7H_{12}N_2O_4K]^+$ (m/z 227,04221). A espécie química resultante da perda de uma molécula de água foi detetada a m/z 171,07617. No modo negativo este composto foi igualmente visível na forma de ião $[C_7H_{11}N_2O_4]^-$. O espectro MS^2 (Figura 5.43) originou um conjunto de produtos de fragmentação característicos deste composto: $[C_6H_7N_2O_2]^-$, m/z 127,05224; $[C_4H_9N_2O]^-$, m/z 101,07240; $[C_4H_7N_2]^-$, m/z 83,06131; $[C_4H_6NO]^-$, m/z 84,04514, $[C_2H_9NO_2]^-$, m/z 74,02446 e $[C_2H_9NO]^-$, m/z 58,02922.

5 Procedimento Experimental

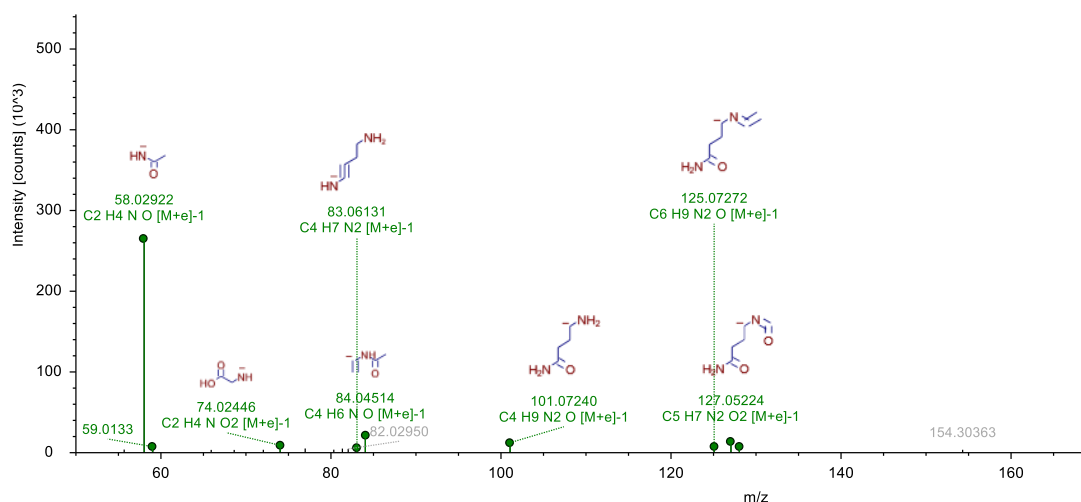


Figura 5.43 Espectro MS² da *N*-acetilglutamina.

A asparagina, utilizada na biossíntese de proteínas, foi detetada sob a forma desprotonada [C₄H₇N₂O₃]⁻, m/z 131,04634 com um desvio de 0,72 ppm. O precursor da asparagina é o oxaloacetato. O oxaloacetato é convertido em aspartato através de uma transaminase. A enzima transfere o grupo amino do glutamato para o oxaloacetato, produzindo α-cetoglutarato e aspartato. A enzima asparagina sintetase produz asparagina, AMP (adenosina monofosfato), glutamato e pirofosfato a partir de aspartato, glutamina e ATP (adenosina trifosfato) - Figura 5.44. Na reação da asparagina sintetase, o ATP é usado para ativar o aspartato, formando β-aspartil-AMP. A glutamina doa um grupo amónio, que reage com β-aspartil-AMP para formar asparagina e AMP.

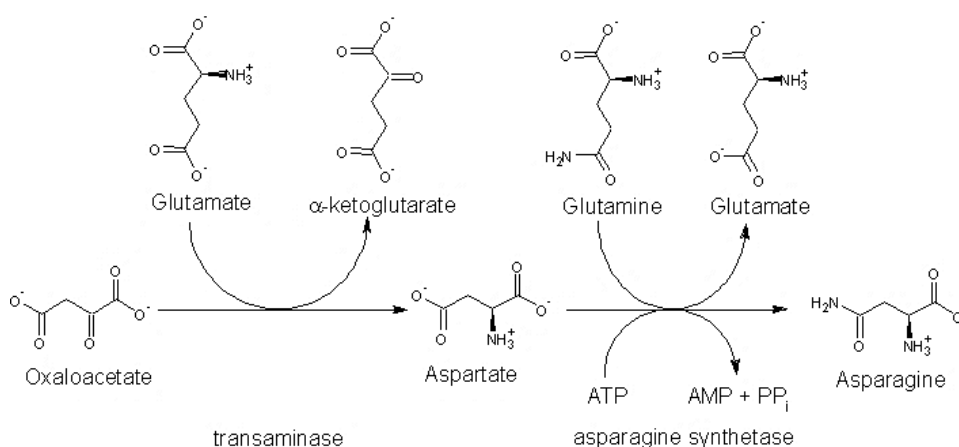


Figura 5.44 Síntese da asparagina [329].

5 Procedimento Experimental

Estes aminoácidos, à semelhança dos aminoácidos essenciais, também são excretados através da transpiração.

Os aminoácidos podem reagir entre si, formando péptidos através da reação química representada na Figura 5.45.

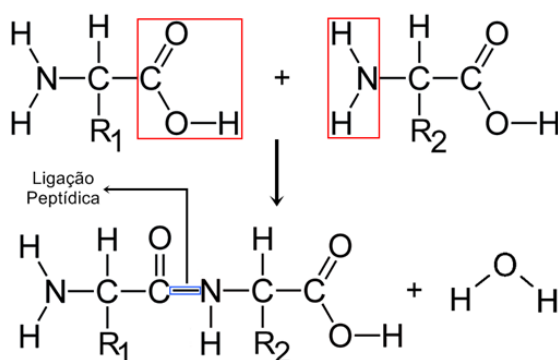


Figura 5.45 Reacção química entre dois aminoácidos.

Nestas experiências foram detetados 5 péptidos de aminoácidos: Gly-Pro [C₇H₁₃N₂O₃]⁺ (m/z 173,09187, desvio de -1,05 ppm); ciclo (His-Pro) [C₇H₁₄N₄O₂]⁺ (m/z 235,11855, desvio de -2,71 ppm); Gly-Leu [C₈H₁₆N₂O₃]⁺ (m/z 189,12320, desvio de 0,82 ppm); Gly-Ser [C₅H₉N₂O₄]⁻ (m/z 161,05685, desvio de 0,62 ppm) e Gly-Phe [C₁₁H₁₅N₂O₃]⁺ (m/z 223,10738, desvio de -1,35 ppm).

De realçar que existe uma grande variabilidade dos constituintes das impressões digitais, pelo que nem todos os aminoácidos foram detetados. Na análise do perfil de aminoácidos de 20 dadores de impressões digitais por LC-MS, Marcel de Puit e colaboradores [330] também concluíram a existência de uma grande variabilidade na deteção destes componentes, observaram que o aminoácido mais abundante era a serina. Croxton [331], na análise efetuada por GC-MS, não detetou arginina, cistina, histidina, hidroxiprolina, metionina e triptofano nas impressões digitais estudadas.

A aminoacetona (1-aminopropan-2-one) foi identificada sob a forma do ião positivo [C₃H₈NO]⁺ (m/z 74,06000). A sua origem pode ser endógena através da oxidação da treonina pelo NAD⁺ em glicina e acetil-CoA, mas quando a proporção acetil-CoA / CoA aumenta por privação nutricional (por exemplo, na diabetes) a enzima treonina desidrogenase produz aminoacetona [332], a Figura 5.46 mostra de forma simplificada esta síntese. Este metabolito apenas foi detetado em vestígios de 3 dadores do género feminino. No espectro de massa MS² deste

composto verifica-se a existência de um produto de fragmentação a m/z 56,04963, correspondente a $[C_3H_6N]^+$ pela perda de uma molécula de água.

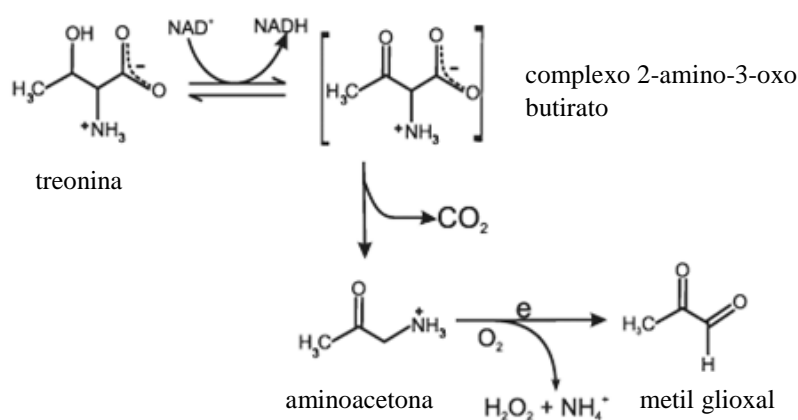


Figura 5.46 Síntese da aminoacetona a partir da treonina [333].

A dimetiletanolamina (2-(dimetilamino)etan-1-ol) foi detetada sob a forma protonada $[C_4H_{12}NO]^+$, m/z 90,09129. No espectro de massa MS^2 observa-se o produto de fragmentação $[C_4H_8N]^+$, m/z 70,06510 pela perda de 20,02619 Da. Este composto pode ser usado como aditivo alimentar e também no tratamento de transtorno de défice de atenção e hiperatividade. Foram também detetados compostos que são usualmente excretados pela urina, como por exemplo o ácido úrico $[C_5H_3N_4O_3]^-$, m/z 167,02097 e o ácido pipecólico $[C_6H_{12}NO_2]^+$, 130,08591. A trigonelina, detetada sob a forma protonada $[C_7H_8NO_2]^+$, m/z 138,05482, é um produto do metabolismo da vitamina B3 e é excretada pela urina, sendo um biomarcador para o consumo de café, legumes e produtos à base de soja. Verifica-se a presença de testosterona $[C_{19}H_{29}O_2]^+$, m/z 289,21597 e (S)-2,3-epoxiesqualeno $[C_{30}H_{51}O]^+$, m/z 427,39331, porém não foi possível obter espectros MS^2 para estes compostos.

A guanina (2-amino-6-hidroxipurina) $[C_5H_6N_5O]^+$, m/z 152,05659 é um derivado da purina, apresenta o espectro de massa MS^2 representado na Figura 5.47. Este espectro apresenta produtos de fragmentação característicos deste composto, como por exemplo o $[C_5H_6N_4O]^+$, m/z 135,02991 (perda de NH_3), o $[C_5H_4N_5]^+$, m/z 134,04573 (perda de H_2O) e o $[C_4H_4N_3O]^+$, m/z 110,03481 (perda de CH_2N_2).

5 Procedimento Experimental

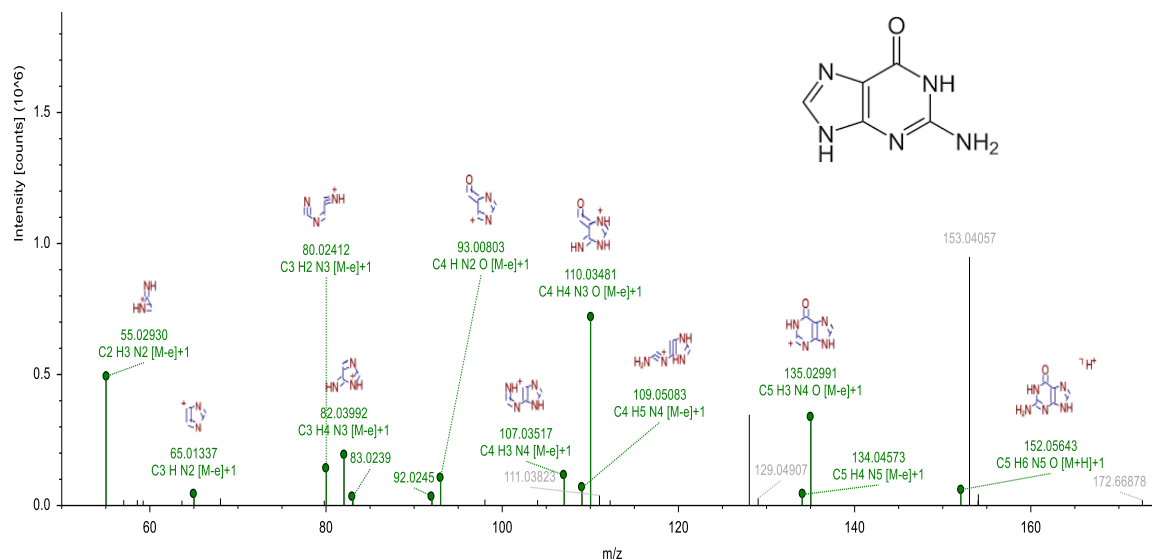
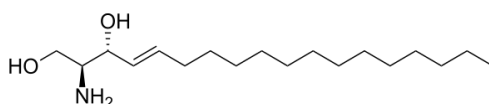


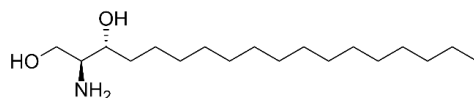
Figura 5.47 Espectro de massa MS² da guanina.

A esfinganina ((2S,3R)-2-aminooctadecano-1,3-diol) foi identificada sob a forma da molécula protonada $[C_{18}H_{40}NO_2]^+$ (m/z 302,30496). A esfinganina é uma das 3 bases esfingóides – ver Figura 5.48, que formam os esfingolípidos.

Esfingosina



Esfinganina



Fitoesfingosina

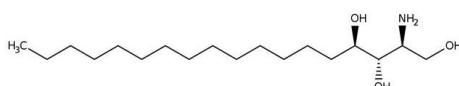


Figura 5.48 Bases esfingóides que formam os esfingolípidos.

A fitoesfingosina foi detetada sob a forma protonada $[C_{18}H_{40}NO_3]^+$, m/z 318,29959 com desvio de -1,54 ppm. Foram ainda detetados a C17 esfingosina sob a forma da molécula protonada $[C_{17}H_{36}NO_2]^+$, m/z 286,27353 com um desvio de -2,76 ppm e a C20 esfinganina também na mesma forma protonada $[C_{20}H_{44}NO_2]^+$, m/z 330,33624 com um desvio de -1,44 ppm.

Foram identificados os ácidos gordos palmítico $[C_{16}H_{31}O_2]^-$ (m/z 255,23283), linoleico $[C_{18}H_{31}O_2]^-$ (m/z 279,23340), octadecanóico $[C_{18}H_{35}O_2]^-$ (m/z 283,26419) e oleico, detetado nas formas adutada $[C_{18}H_{34}O_2+NH_4]^+$ (m/z 300,28928) e protonada $[C_{18}H_{35}O_2]^+$ (m/z 283,26248). Uma metodologia de análise geral para estes compostos é baseada na espectrometria de massa dos aniões carboxilados. Os espectros obtidos por ESI e APCI no modo negativo, por exemplo, são caracterizados pela presença apenas do ião molecular e iões respeitantes à sua distribuição isotópica (sem a presença de fragmentos) [334]. Tal característica permite a determinação da massa molecular dos ácidos gordos mesmo na presença de uma mistura complexa. No entanto, estes espectros não permitem obter informação estrutural. Esta limitação geralmente é ultrapassada quando se consegue obter espectros de massa por MS^2 . No presente caso, porém, apenas foi conseguido obter este tipo de espectro no caso do ácido oleico, mas devido à existência de poucos picos de fragmentação não é possível uma identificação inequívoca. Verifica-se apenas a presença dos produtos de fragmentação $[C_4H_9O_2]^+$ (m/z 89,05973), $[C_5H_{11}]^+$ (m/z 71,08554) e $[C_4H_9]^+$ (m/z 57,07009).

O ácido (S)-abscísico, detetado sob a forma do ião negativo $[C_{15}H_{19}O_4]^-$, m/z 263,12878, é um prenol que pertence à classe dos sesquiterpenóides. Este metabolito participa no processo bioquímico do transporte lipídico e também no metabolismo dos ácidos gordos. O 4,4-dimetil-14 α -formil-5 α -colest-8-en-3 β -ol, detetado na forma protonada $[C_{30}H_{51}O_2]^+$, m/z 443,38867, é um 3- β -hidroxisterol que é um intermediário na biossíntese do colesterol. É um substrato para a lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51A1) e pode ser gerado a partir da oxidação enzimática de 4,4-dimetil-14 α -hidroximetil-5 α -colest-8-en-3 β -ol. O 7-dehidrodesmosterol foi detetado sob a forma protonada $[C_{27}H_{43}O]^+$, m/z 383,33081. Este composto é um intermediário esterol na biossíntese de esteróides. O 7-desidrodesmosterol é um substrato da enzima 24-desidrocolesterol redutase, uma enzima importante na biossíntese do colesterol. O colesterol é sintetizado a partir de latosterol, 7-desidrocolesterol, desmosterol ou colest-enol pela enzima 3 β -hidroxisterol- Δ^7 -redutase.

A α,α trehalose (α -D-glucopiranosil- (1 \rightarrow 1) - α -D-glucopiranosídeo) é um dissacarídeo com duas unidades de glucose, com propriedades antioxidantes, detetado sob a forma do ião negativo adutado com ácido fórmico (FA) $[C_{12}H_{22}O_{11}+FA-H]^-$, m/z 387,11456, em 121 dos

vestígios analisados. Foi também detetado com menor intensidade na sua forma desprotonada (m/z 341,10895) e adutado com cloro (m/z 377,08572). No espectro de massa MS^2 observam-se os seguintes produtos de fragmentação (Figura 5.49): $[C_5H_7O_4]^-$, m/z 131,03583; $[C_4H_7O_4]^-$, m/z 119,03481; $[C_5H_5O_3]^-$, m/z 113,02452; $[C_4H_5O_3]^-$, m/z 101,02431; $[C_3H_5O_3]^-$, m/z 89,02415; $[C_3H_3O_2]^-$, m/z 71,01340 e $[C_2H_3O_2]^-$, m/z 59,01328. Este metabolito é amplamente utilizado como aditivo em alimentos e cosméticos [335].

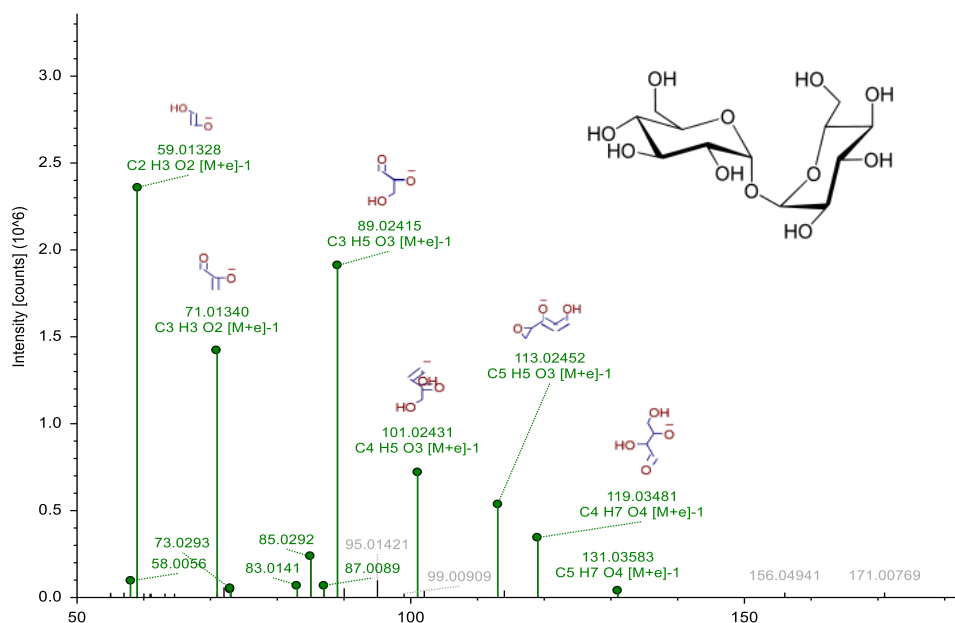


Figura 5.49 Espectro de massa MS^2 da α,α trehalose.

5.3.3.2 Estudo da intra-variabilidade

Bécue e colaboradores [336], recentemente estudaram a intra e inter-variabilidade num pequeno grupo de indivíduos. No estudo da intra-variabilidade utilizaram 24 vestígios de uma dadora do género feminino, 8 de cada tipo de vestígio; secreção écrina, secreção sebácea e natural. Pela análise PCA puderam distinguir a proveniências dos resíduos de impressões digitais. Por outro lado, concluíram que há uma persistência da composição química com o tempo.

O presente estudo foi conduzido apenas em vestígios de impressões digitais naturais, que por si só, englobam os outros tipos de secreção. Realizaram-se, ao longo de 5 dias, análises a vestígios dermopapilares de um mesmo dador do género feminino, a título exemplificativo. Neste período, foram apostas (diariamente) numa superfície de papel de alumínio as impressões

5 Procedimento Experimental

digitais de alguns dedos do dador. Da totalidade de amostras, 25 foram consideradas válidas para análise, as quais foram realizadas nos referidos 5 dias (Figura 5.50).

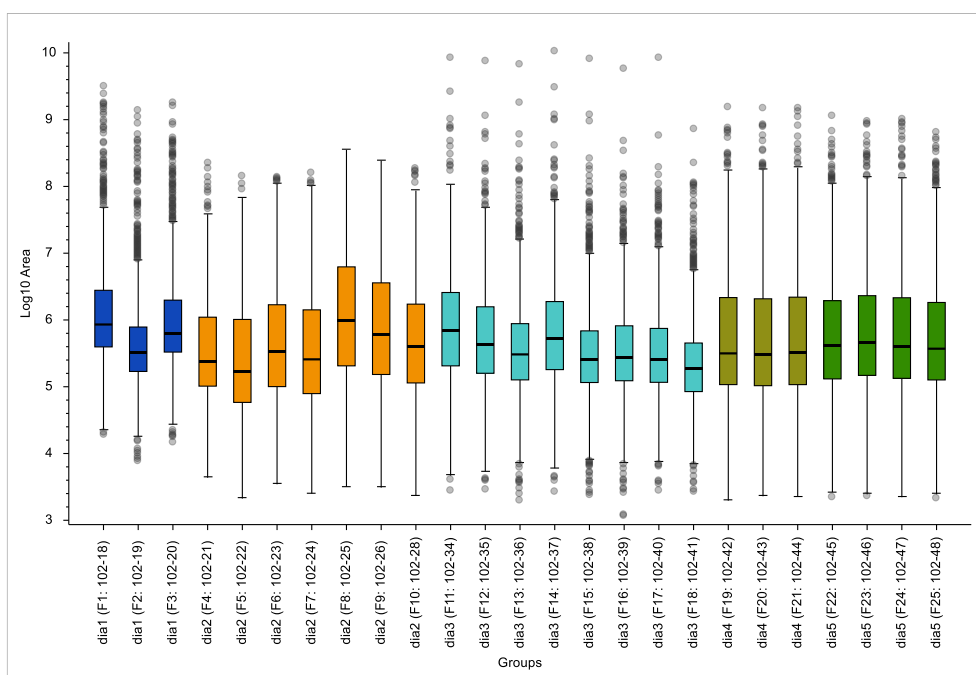


Figura 5.50 Diagramas de caixa de cada amostra recolhidas nos cinco dias.

Constata-se a intra-variabilidade de um dador, no mesmo dia e em dias diferentes. Apesar da grande variabilidade encontrada foi possível agrupar, através da análise estatística PCA, as amostras por dias, sendo que todas elas são do mesmo dador. O PC 1 explica 21,9% da variância encontrada, enquanto o PC 4 explica 8,8%. Este gráfico é o que melhor ilustra a separação das amostras por dias (Figura 5.51). Nas análises realizadas foram detetados vários compostos, estando listados na Tabela 5.17 alguns dos compostos presentes nos 5 dias de análises.

5 Procedimento Experimental

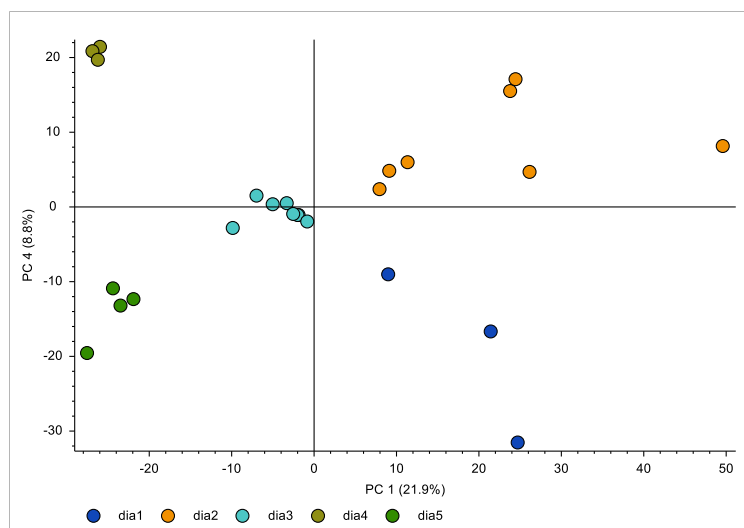


Figura 5.51 Análise PCA das amostras recolhidas nos cinco dias.

Tabela 5.17 Alguns dos compostos detetados em todos os dias de aposição dos vestígios, com desvio inferior a 1,5 ppm.

m/z experimental	Fórmula química	Identificação putativa
74,04395	$[C_3H_7O_2]^-$	lactaldeído
89,02415	$[C_3H_5O_3]^-$	ácido láctico
100,11179	$[C_6H_{14}N]^+$	ciclohexilamina
104,10668	$[C_5H_{14}NO]^+$	valinol
104,03524	$[C_3H_6NO_3]^-$	serina
114,06590	$[C_4H_8N_3O]^+$	creatinina
115,08648	$[C_5H_{11}N_2O]^+$	1-nitrosopiperidina
116,07026	$[C_5H_{10}NO_2]^+$	prolina
117,01943	$[C_4H_5O_4]^-$	ácido succínico
118,08600	$[C_5H_{12}NO_2]^+$	valina
127,07256	$[C_3H_7N_6]^+$	melanina
130,09734	$[C_5H_{12}N_3O]^+$	4-guanidinobutanal
132,07635	$[C_4H_{10}N_3O_2]^+$	creatina
132,10150	$[C_6H_{14}NO_2]^+$	leucina
133,09674	$[C_5H_{13}N_2O_2]^+$	ornitina
137,09596	$[C_9H_{13}O]^+$	álcool 3,4-dimetil-benzílico
139,05011	$[C_6H_7N_2O_2]^+$	4-nitroanilina
141,06561	$[C_8H_9N_2O_2]^+$	ácido acético metil-imidazole
146,04285	$[C_5H_8NO_4]^-$	ácido glutâmico
146,11739	$[C_7H_{16}NO_2]^+$	3-dehidroxycarnitina
148,99112	$[C_4H_5O_4S]^-$	ácido tiomático
150,11241	$[C_6H_{16}NO_3]^+$	trietanolamina
151,09631	$[C_6H_{15}O_4]^+$	trietilenoglicol
162,11234	$[C_7H_{16}NO_3]^+$	carnitina
166,08583	$[C_9H_{12}NO_2]^+$	fenilalanina
173,09178	$[C_7H_{13}N_2O_3]^+$	Gly-Pro
175,11847	$[C_6H_{15}N_4O_2]^+$	arginina
176,10271	$[C_6H_{14}N_3O_3]^+$	citrulina
182,05728	$[C_7H_8N_3O_3]^+$	etil 4-amino-2-hidroxipirimidina – 5 -carboxilato
212,11790	$[C_{13}H_{14}N_3]^+$	1,3-difenilguanidina
221,15347	$[C_{14}H_{21}O_2]^+$	2,6-di-tert-butilbenzoquinona
223,10739	$[C_{11}H_{15}N_2O_3]^+$	Gly-Phe
289,21579	$[C_{19}H_{29}O_2]^+$	testosterona ou outra hormona
330,33563	$[C_{20}H_{44}NO_2]^+$	C20 esfinganina

5 Procedimento Experimental

Também foram detetados, em todos os dias, esqualeno e prostanglandinas, contudo a valores de m/z com desvio acima dos 1,5 ppm. Verifica-se uma grande variação nos aminoácidos, por exemplo, entre os diferentes dias de aposição, o que já era expectável. As Figuras 5.52, 5.53 e 5.54 ilustram essas variações nos 5 dias de aposição das impressões digitais do dador em estudo. No dia 3 os vestígios são mais ricos em todos os aminoácidos aqui descritos, à excepção do ácido glutâmico que apenas tem uma abundância significativa no dia 1. O aminoácido alanina tem uma abundância quase nula no dia 2. A valina foi detetada nos dias 1, 3 e 5, sendo o dia 3 o que apresenta maior abundância deste aminoácido. Os péptidos Phe-Ala e Gly-Phe estão presentes de forma signitficativa em todos os dias.

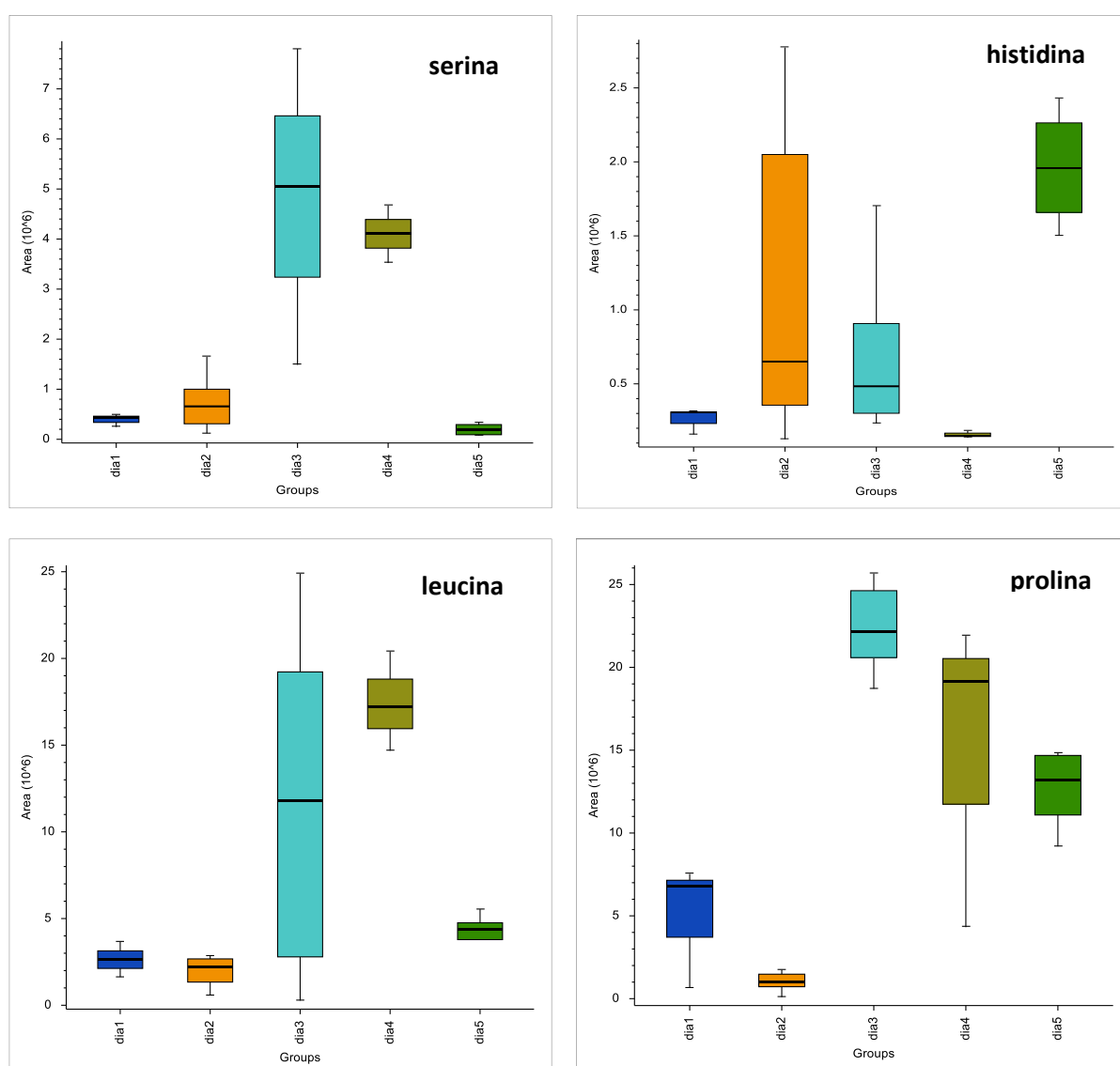


Figura 5.52 Diagramas de caixa dos aminoácidos serina, histidina, leucina e prolina nos cinco dias de recolha dos vestígios das impressões digitais de um dador.

5 Procedimento Experimental

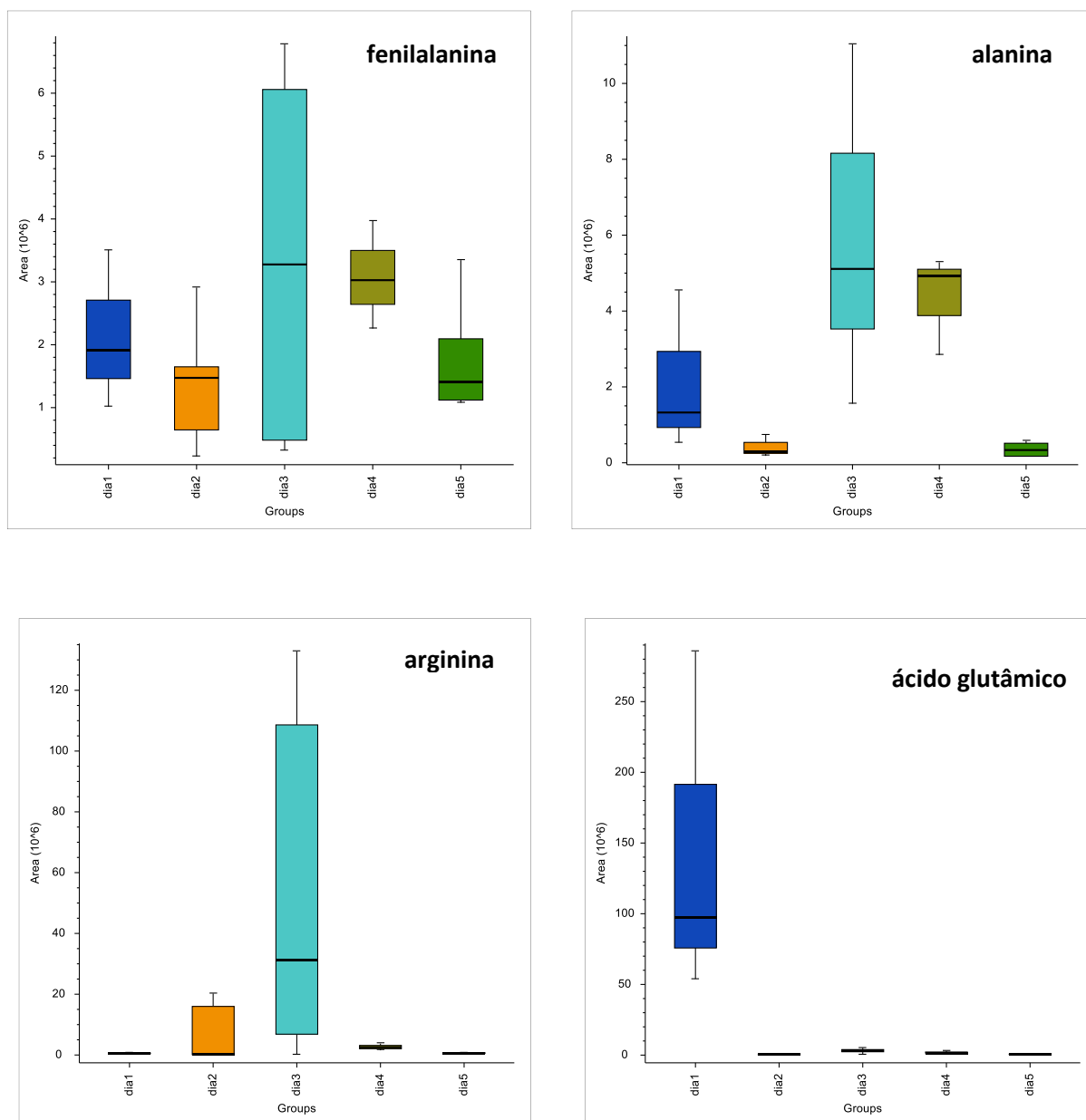


Figura 5.53 Diagramas de caixa dos aminoácidos fenilalanina, alanina, arginina e ácido glutâmico nos cinco dias de recolha dos vestígios das impressões digitais de um dador.

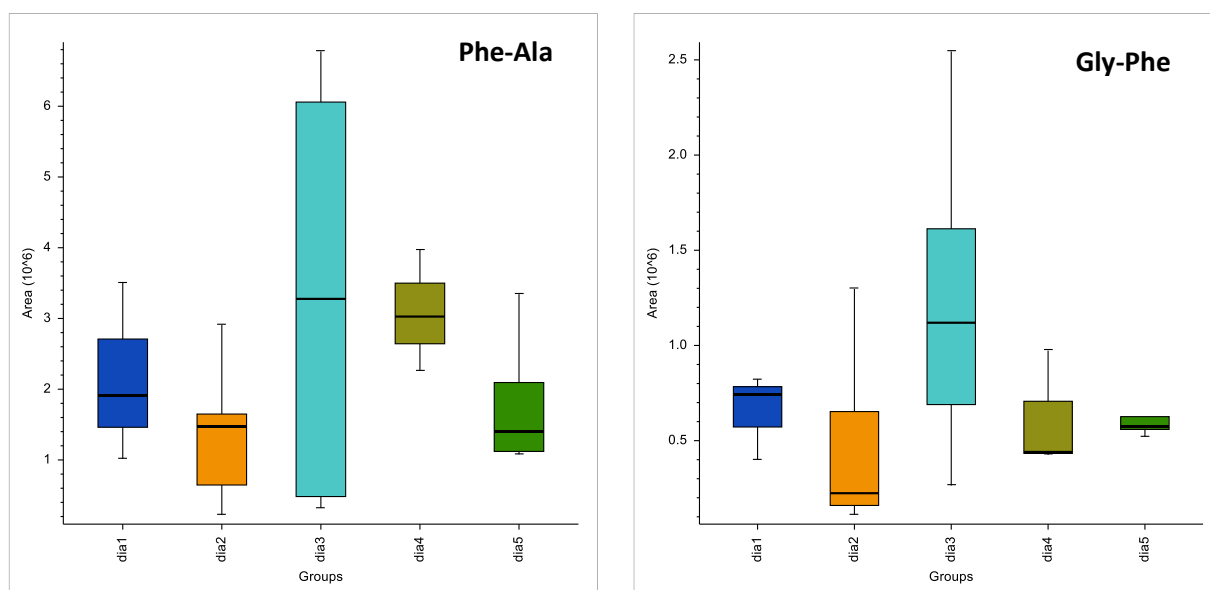


Figura 5.54 Diagramas de caixa dos péptidos Phe-Ala e Gly-Phe detetados nos cinco dias de recolha de vestígios de um dador.

A trietanolamina, creatina e o lactaldeído, por exemplo, foram detetadas em todos os dias apresentando também uma grande variação nestes vestígios (Figura 5.55).

A percepção desta intra-variabilidade é extremamente importante para a construção de modelos de classificação.

5 Procedimento Experimental

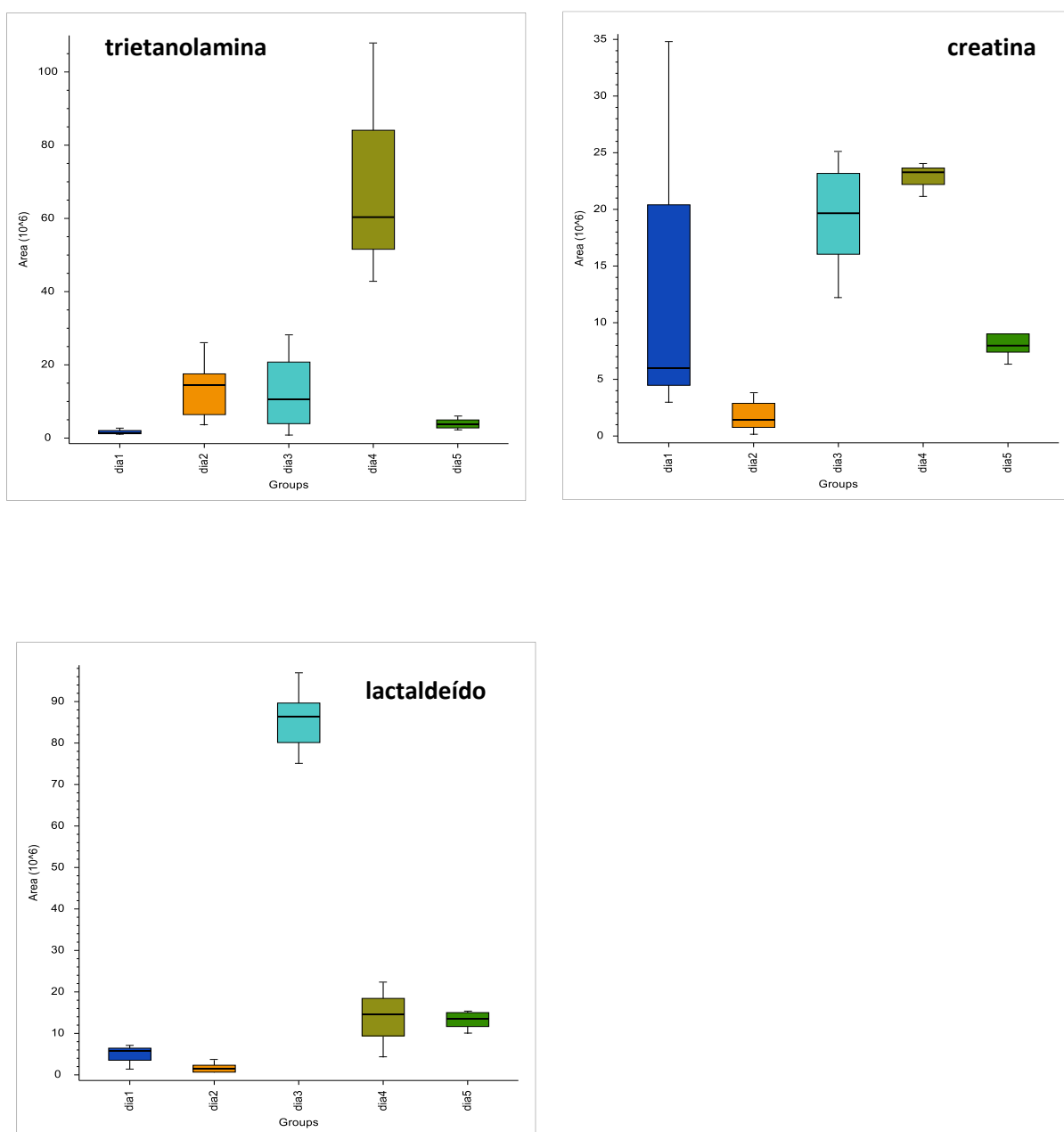


Figura 5.55 Diagramas de caixa da trietanolamina, creatina e lactaldeído detetados nos cinco dias de recolha de vestígios de um dador.

5.3.3.3 Diferenciação de género

A identificação do suspeito de um crime nem sempre é conseguida pelos métodos já implementados nos laboratórios forenses, pelo que determinar características intrínsecas ao indivíduo irá fornecer mais informação à investigação criminal.

De forma a ter elementos diferenciadores que permitam a categorização da informação, foram processadas 285 amostras de vestígios de impressões digitais latentes de 99 indivíduos, 46 do género feminino e 53 do género masculino, com idades compreendidas entre os 19 e os 63 anos.

Aplicando o sistema cromatográfico 2 a 97 amostras obteve-se o gráfico representado na Figura 5.56. O PC1 explica 16,5% da variância entre os dois grupos e o PC2 explica 7,3% da variância. A análise estatística de PCA mostrou a existência de dois grupos: feminino e masculino. Tal como observado para os resultados anteriormente descritos para o FT-ICR com recurso a esta ferramenta estatística, existem *outliers* femininos no grupo masculino. Pelo gráfico da Figura 5.57 podemos ver a contribuição das espécies químicas na diferenciação dos dois grupos. Os pontos mais afastados (nos cantos) têm uma forte contribuição para os componentes principais, ou seja, estes pontos diferenciam os grupos em estudo.

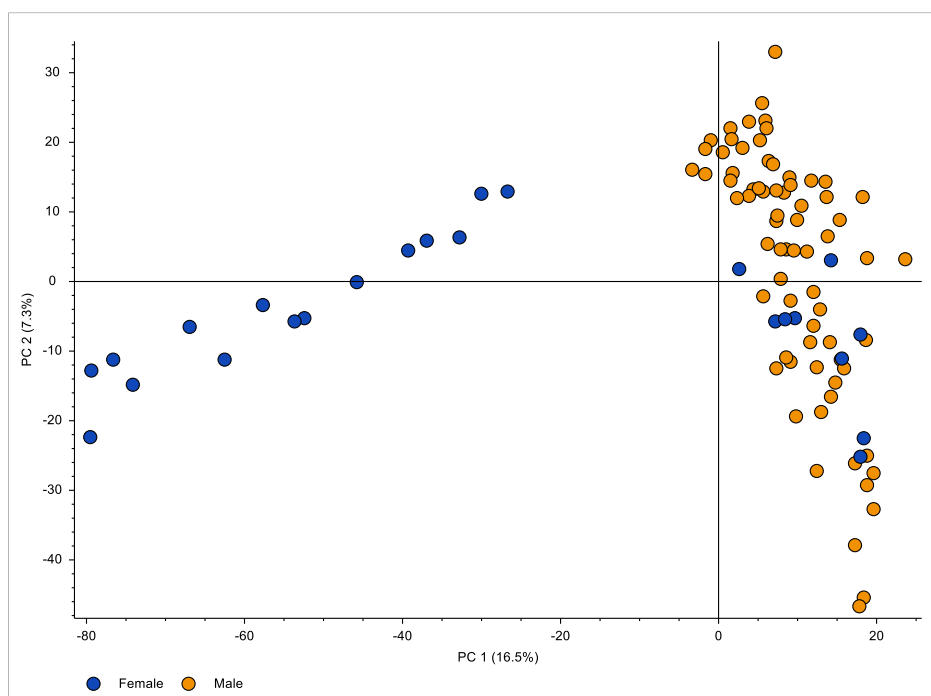


Figura 5.56 Análise PCA de 97 vestígios.

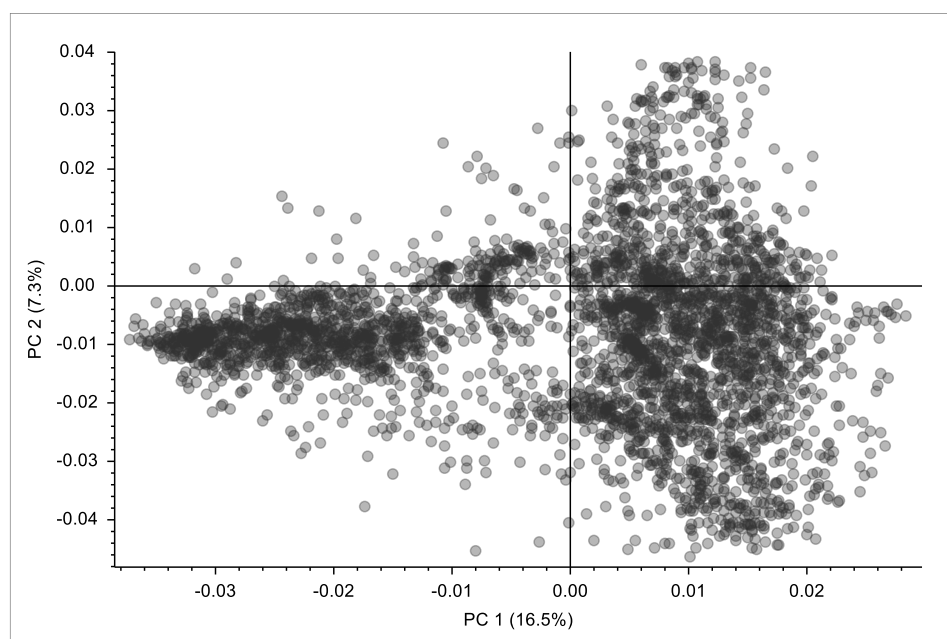


Figura 5.57 Gráfico dos compostos que explicam a variância do PC1 vs PC2.

Embora pelo gráfico da Figura 5.57 seja possível identificar os compostos que explicam a diferenciação dos dois grupos em estudo: feminino vs masculino, obteve-se por fazer essa identificação putativa com uma probabilidade associada usando a ferramenta estatística ANOVA.

O *Heatmap* destaca a variação de intensidade dos iões discriminantes através do gradiente de cor. A análise dos *clusters* é bastante complexa devido à existência de *outliers* femininos (Figura 5.58). A existência deste comportamento evidencia, mais uma vez, a inter-variabilidade entre os vestígios. O agrupamento hierárquico foi efetuado usando a distância euclidiana e o método de variância mínima, denominado de Ward. Neste método a formação dos grupos dá-se pela maximização da homogeneidade dentro de cada um deles. A soma de quadrados dentro dos grupos é usada como medida de homogeneidade. Isto é, o método de Ward tenta minimizar a soma de quadrados dentro do grupo. Os grupos formados em cada passo são resultantes de grupo solução com a menor soma de quadrados. Comparativamente aos outros métodos constantes do software, este foi o que produziu melhores resultados.

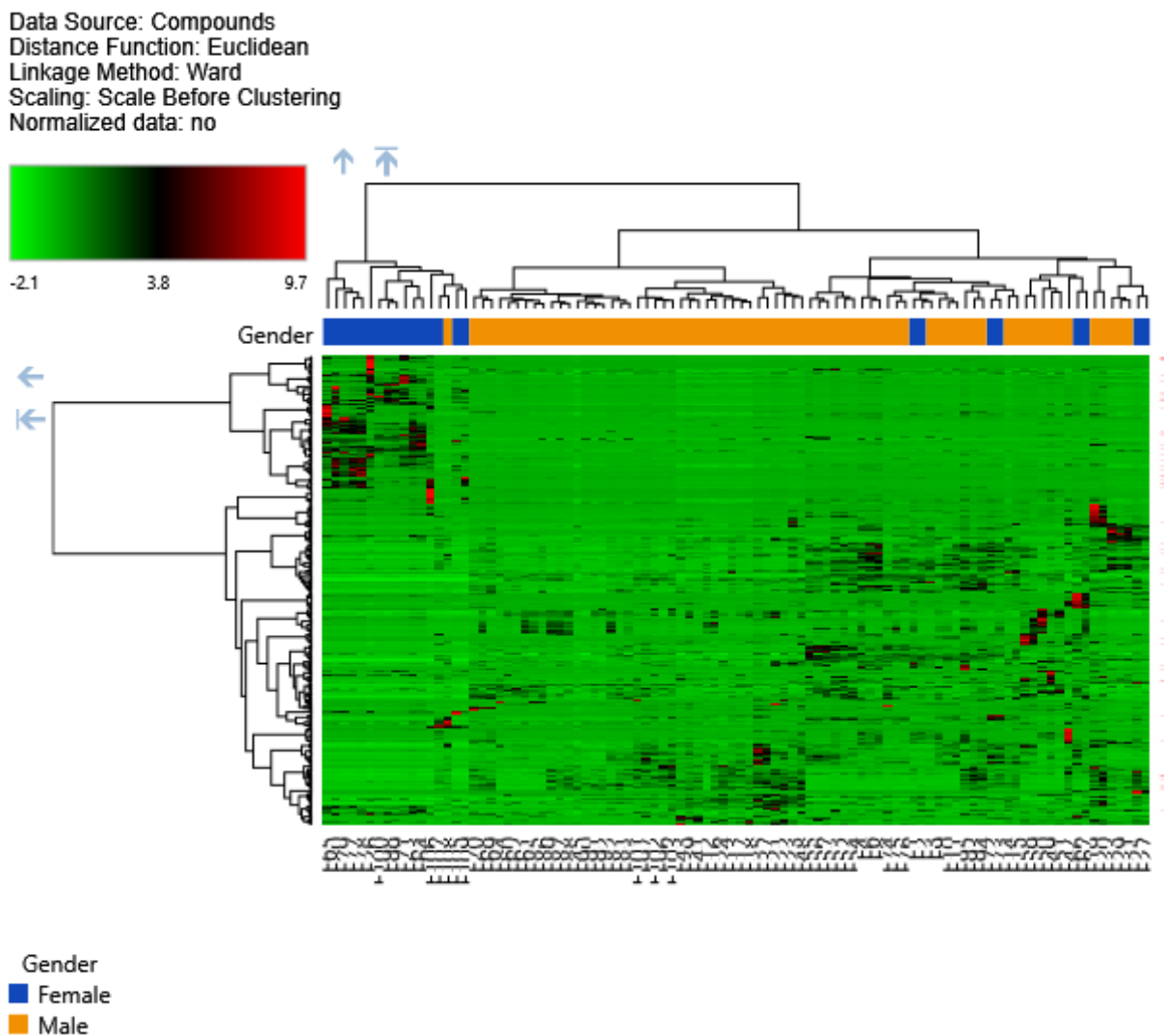


Figura 5.58 Dendrograma e *Heatmap* representativo dos iões discriminantes e sua classificação de acordo com o género (masculino ou feminino). O gradiente de cores representa variações de intensidade.

De qualquer forma, e apesar das variações encontradas, é possível concluir mais uma vez que os vestígios das impressões digitais permitem a diferenciação entre indivíduos.

Com a metodologia aplicada neste estudo e a aplicação de métodos estatísticos como o PLS-DA é possível identificar compostos que em conjunto possibilitam a diferenciação de género – ver Figura 5.59.

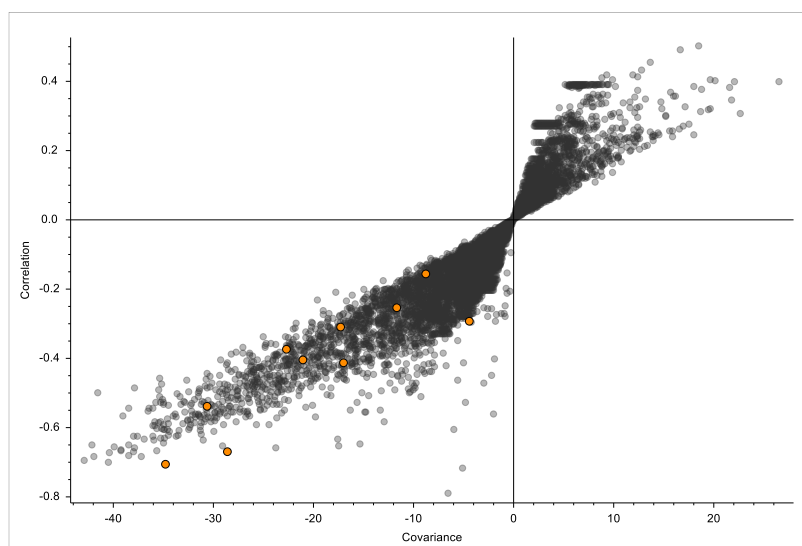


Figura 5.59 Gráfico de PLS-DA onde são assinalados a amarelo os compostos discriminantes.

Através desta ferramenta estatística foram identificados os compostos constantes na Tabela 5.18.

Tabela 5.18 Compostos discriminantes de género.

Identificação putativa	Género F/M	Fórmula	m/z experimental
éster dodecil N,N-dimetilamina	M	$[C_{17}H_{36}NO_2]^+$	286,27316
triheptilamina	F	$[C_{21}H_{46}N]^+$	312,36127
11-metil-N(8-metilnonil)-1-dodecanamina	F	$[C_{23}H_{50}N]^+$	340,39261
creatinina	M	$[C_4H_8N_3O]^+$	114,06596
ascorbil glucósido	M	$[C_{12}H_{17}O_{11}]^-$	337,07803
16- α -(metiltio)progesterona	F	$[C_{22}H_{33}O_2S]^+$	361,22119

A triheptilamina, por exemplo, é predominante nos dadores femininos (Figura 5.60).

5 Procedimento Experimental

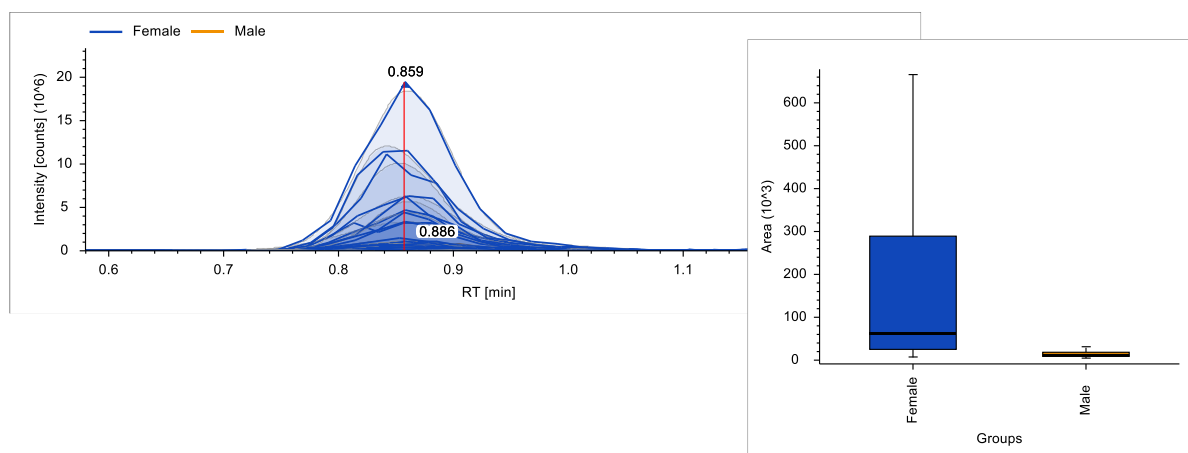


Figura 5.60 Cromatograma e diagrama de caixa que indicam a predominância da triheptilamina em dadores do género feminino.

O composto 16- α -(metiltio)progesterona aparece nos espectros de massa na sua forma protonada $[C_{22}H_{33}O_2S]^+$, m/z 361,22119 e também com adutos $[M+H+H_2O]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ e $[M+K]^+$, como se pode ver no espectro da Figura 5.61. Este composto é igualmente predominante em dadores do género feminino.

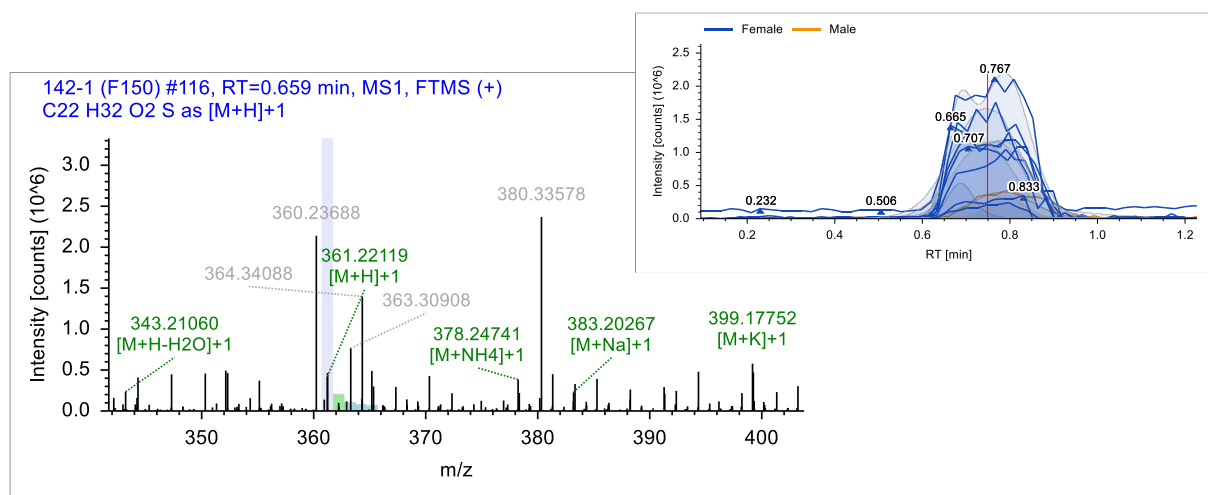


Figura 5.61 Cromatograma e espectro de massa da 16- α -(metiltio)progesterona.

Para além destes compostos também foram identificados outros com predominância num dos géneros com base na análise de variância ANOVA de 285 amostras (135 do género feminino e 150 do género masculino), como se pode ver nas Tabelas 5.19 e 5.20.

ANOVA ou análise de variância é usada para comparar a distribuição de três ou mais grupos em amostras independentes. Esta ferramenta é também uma forma de resumir um modelo de regressão linear através da decomposição da soma dos quadrados para cada fonte de variação no modelo e, utilizando o teste F. Assim, temos a hipótese nula: não há diferença entre as amostras do grupo para a variável testada (neste caso o género) e a hipótese alternativa: há diferença entre as amostras do grupo para a variável testada. Vamos, deste modo, comparar a variância entre cada amostra e entre amostras diferentes. Os resultados podem ser visualizados através de gráficos denominados *Volcano plot*, em que os valores m/z estão representados de acordo com o valor de p (probabilidade) e $\text{Log}_2 \text{Fold Change}$. O p -value varia entre 0 e 1. Um baixo valor de p -value indica que podemos rejeitar a hipótese nula com uma baixa probabilidade de erro, enquanto um valor alto de p -value significa que podemos aceitar a hipótese nula com baixa probabilidade de erro. O *Fold change* é uma medida que descreve a amplitude de variação entre o original e a medida subsequente, sendo expressa numa escala logarítmica.

Tabela 5.19 Lista de compostos com predominância no género feminino.

Identificação putativa	Fórmula	m/z experimental	Desvio/ppm	p-value	Log 2 Fold change
lactaldeído	$[\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2]^+$	75,04400	1,15	$8,5 \times 10^{-5}$	3,38
ácido 2S-amino-pentanóico	$[\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$	118,08596	-2,91	$9,8 \times 10^{-11}$	1,83
5-oxo-L-prolina	$[\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_3]^-$	128,03517	0,62	$6,3 \times 10^{-5}$	4,56
trietanolamina	$[\text{C}_6\text{H}_{16}\text{NO}_3]^+$	150,11234	-0,88	$3,9 \times 10^{-3}$	2,27
mio-inositol	$[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^+$	179,05609	-0,72	$1,2 \times 10^{-6}$	1,19
fenilgloxilato de metilo	$[\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_3+\text{NH}_4]^+$	182,08102	0,84	$0,1 \times 10^{-5}$	3,74
amino DHQ	$[\text{C}_7\text{H}_{12}\text{NO}_5]^+$	190,07123	-1,12	$5,0 \times 10^{-4}$	2,63
ácido abscisico	$[\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{O}_4]^+$	263,12878	0,52	$1,0 \times 10^{-5}$	-1,14
ácido eicosanóico	$[\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{O}_2]^+$	313,30991	-2,09	$2,7 \times 10^{-5}$	1,51
tributil citrato	$[\text{C}_{18}\text{H}_{33}\text{O}_7]^+$	361,22134	0,40	$1,5 \times 10^{-5}$	1,43

Tabela 5.20 Lista de compostos com predominância no género masculino.

Identificação putativa	Fórmula	m/z experimental	Desvio /ppm	p-value	Log 2 Fold change
serina	[C ₃ H ₆ NO ₃] ⁻	104,03517	1,39	5,9x10 ⁻⁵	-2,09
1,3,5-trimetilpirazole	[C ₆ H ₁₁ N ₂] ⁺	111,09151	-1,25	5,8x10 ⁻⁵	-1,91
ácido fumárico	[C ₄ H ₃ O ₄] ⁻	115,00365	0,30	1,2x10 ⁻⁵	-2,30
prolina	[C ₅ H ₁₀ NO ₂] ⁺	116,07050	1,39	4,4x10 ⁻⁴	-2,07
2-metil-serina	[C ₄ H ₁₀ NO ₃] ⁺	120,06541	0,73	3,1x10 ⁻³	-2,55
3-vinilnilina	[C ₈ H ₁₀ N] ⁺	120,08058	-1,24	4,5x10 ⁻⁶	-1,70
fenilacetaldéido	[C ₈ H ₉ O] ⁺	121,06454	-0,95	4,3x10 ⁻⁷	-1,20
taurina	[C ₂ H ₆ NO ₃ S] ⁺	124,00729	0,78	7,4x10 ⁻⁶	-3,75
ácido ciclohexanocarboxílico	[C ₇ H ₁₁ O ₂] ⁻	127,07639	0,50	8,2x10 ⁻⁵	-4,09
ácido glutacónico	[C ₅ H ₅ O ₄] ⁻	129,01936	-0,08	1,5x10 ⁻³	-0,61
isoleucina	[C ₆ H ₁₄ NO ₂] ⁺	132,10168	-1,17	1,5x10 ⁻⁴	-1,69
aspartato	[C ₄ H ₆ NO ₄] ⁻	132,03018	0,18	2,6x10 ⁻⁴	-1,65
creatina	[C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₂] ⁺	132,07660	-1,01	1,2x10 ⁻¹⁰	-3,83
ornitina	[C ₅ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺	133,09702	0,96	1,7x10 ⁻⁵	-1,84
trigonelina	[C ₇ H ₈ NO ₂] ⁺	138,05482	0,90	7,6x10 ⁻⁴	-1,60
ácido glutâmico	[C ₅ H ₈ NO ₄] ⁻	146,04593	-0,11	2,3x10 ⁻⁵	-4,15
ácido 4-oxohex-2-enedióico	[C ₆ H ₅ O ₅] ⁻	157,01421	0,46	8,9 x 10 ⁻⁴	-1,49
carnitina	[C ₇ H ₁₆ NO ₃] ⁺	162,11230	-0,93	9,1x10 ⁻⁷	-2,22
ácido isoftálico	[C ₆ H ₅ O ₄] ⁻	165,01924	-0,65	1,1x10 ⁻⁵	-1,45
fenilalanina	[C ₉ H ₁₂ NO ₂] ⁺	166,08612	0,77	2,7x10 ⁻⁵	-1,60
ácido úrico	[C ₇ H ₃ N ₄ O ₃] ⁻	167,02097	-0,72	3,5x10 ⁻⁶	-1,19
tetrahidrodipicolinato	[C ₇ H ₈ NO ₄] ⁻	170,04584	0,48	4,0x10 ⁻⁵	-2,38
dimetilmaleato	[C ₈ H ₁₁ O ₄] ⁻	171,06621	-0,54	1,0x10 ⁻⁴	-5,12
citrolina	[C ₆ H ₁₄ N ₃ O ₃] ⁺	176,10280	0,89	3,3x10 ⁻⁵	3,63
tirosina	[C ₉ H ₁₂ NO ₃] ⁺	182,08096	-1,01	6,1x10 ⁻⁵	-1,53
N6-acetil-L-lisina	[C ₈ H ₁₇ N ₂ O ₃] ⁺	189,12326	0,58	2,9x10 ⁻⁵	-0,63
triisopropanol amina	[C ₉ H ₂₂ NO ₃] ⁺	192,15927	-0,85	4,1x10 ⁻⁵	-1,07
triptofano	[C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂] ⁺	205,09695	-1,15	9,8x10 ⁻⁵	-1,25
exo-1,7,7-trimetilbiciclo (2,2,1) hep-2-il acrilato	[C ₉ H ₂₂ NO ₃] ⁺	209,15352	-1,96	3,3x10 ⁻⁹	-2,49
carnosina	[C ₉ H ₁₅ N ₄ O ₃] ⁺	227,11328	-2,32	9,4x10 ⁻⁴	-1,74
ciprodenato	[C ₃ H ₂₆ NO ₂] ⁺	228,19513	-2,15	9,3x10 ⁻¹⁰	-2,95
ácido palmitoleico	[C ₁₆ H ₂₉ O ₂] ⁻	253,21727	-0,19	2,1x10 ⁻⁷	-1,32
ácido palmítico	[C ₁₆ H ₃₁ O ₂] ⁻	255,23283	-0,05	1,1x10 ⁻⁶	-1,38
N,N-dimetil-1-pentadecanamina	[C ₁₇ H ₃₈ N] ⁺	256,2991	-2,39	6,9x10 ⁻⁵	-6,12
dietanolamida caprica	[C ₁₄ H ₃₀ NO ₃] ⁺	260,22165	-1,12	4,3x10 ⁻⁷	-1,78
ácido oxopalmítico	[C ₁₆ H ₂₉ O ₃] ⁻	269,21198	0,72	2,8x10 ⁻⁶	-1,08
FA(18:1) ácido 9Z-octadecan-12-unoico	[C ₁₈ H ₃₁ O ₂] ⁺	279,23157	-1,77	8,1x10 ⁻⁵	-5,33
ácido oleico	[C ₁₈ H ₃₅ O ₂] ⁺	283,26248	-1,55	7,2x10 ⁻⁴	-3,44
ácido octadecanóico	[C ₁₆ H ₃₅ O ₂] ⁻	283,26419	0,01	3,0x10 ⁻⁵	-1,37
3,6,9,12 tetraoxatetracosano-1-ol	[C ₂₀ H ₄₃ O ₅] ⁺	363,30942	-1,95	9,1x10 ⁻⁷	-3,00
maltose	[C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ +FA] ⁻	387,11432	-0,36	7,1x10 ⁻⁵	-3,10
14-hidroxilanolsterol	[C ₃₀ H ₅₀ O ₂] ⁺	443,38791	0,91	1,5x10 ⁻⁵	-2,01

Os compostos diferenciadores do género feminino não incluem aminoácidos ao contrário do verificado nos indivíduos do género masculino. Um estudo recente publicado em 2019 [137] refere a L-fenilalanina (*p-value* 0,0003 e *Log 2 Fold change* 1,352) e a L-isoleucina (*p-value* 0,0357 e *Log 2 Fold change* 1,133) como compostos diferenciadores de género em vestígios de impressões digitais, sendo estes compostos mais abundantes no género masculino. No presente estudo, estes dois aminoácidos também são predominantes nos vestígios do género masculino, tendo-se obtido para a fenilalanina um *p-value* de $2,7 \times 10^{-5}$ e *Log 2 Fold change* de -1,60. A isoleucina tem um *p-value* de $1,5 \times 10^{-4}$ e *Log 2 Fold change* de -1,69.

Para além destes aminoácidos também foram identificados como diferenciadores para o género masculino a serina, prolina, aspartato, ornitina, trigonelina, ácido glutâmico, tirosina e triptofano, como se pode ver na Tabela 5.20. Foi detetado um produto de degradação dos aminoácidos, o ácido urocânico $[\text{C}_6\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_2]^+$ (*m/z* 139,04979, desvio -0,68 ppm) porém, este composto não é diferenciador de género. A presença de compostos de degradação não é estranha porque a aposição da impressão digital no suporte não teve como pressuposto qualquer ato de limpeza das mãos.

No âmbito de pesquisas a nível de saúde, foram efetuados diversos estudos no que concerne à avaliação da predominância dos aminoácidos de acordo com o género do indivíduo, e claro, a sua relação com diversas patologias [337]. Lee e colaboradores [338] estudaram o plasma de 685 indivíduos, 45% masculinos e 55% femininos, de onde concluíram que a valina, leucina e iso-leucina são predominantes no género masculino. Takashina e colaboradores [339] concluíram que a valina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, alanina, arginina, asparagina, ácido α -aminobutírico, citrulina, cistina, glutamato, glutamina, glicina, ornitina, prolina, serina, taurina, tirosina, histidina predominavam em indivíduos do género masculino numa população de estudo de 83 indivíduos, 80% masculinos e 20% femininos.

Verifica-se também, como predominantes nos vestígios do género masculino ácidos gordos como o ácido oleico com um valor de *p-value* de $7,2 \times 10^{-4}$ e *Log 2 Fold change* de -3,4; o ácido octadecanóico com um valor de *p-value* $3,0 \times 10^{-5}$ e *Log 2 Fold change* de -1,37; o ácido palmitoleico com um valor de *p-value* $2,1 \times 10^{-7}$ e *Log 2 Fold change* de -1,32 e o ácido palmítico com um valor de *p-value* $1,1 \times 10^{-6}$ e *Log 2 Fold change* de -1,38.

Marcel de Puit e colaboradores [137] usaram um modelo de classificação de género, para os dados obtidos por LC-MS, apenas com três compostos predominantes no género masculino:

guanina ($p\text{-value } 4,53 \times 10^{-4}$, $\text{Log2 Fold change } 1,48$), ácido úrico ($p\text{-value } 8,5 \times 10^{-5}$, $\text{Log2 Fold change } 1,61$) e guanosina ($p\text{-value } 2,30 \times 10^{-3}$, $\text{Log2 Fold change } 2,30 \times 10^{-3}$).

Para além dos aminoácidos, é também notória a presença de outros metabolitos diferenciadores. Na lista de compostos com predominância no género feminino destaca-se o ácido 2S-amino-pentanóico com um $p\text{-value}$ de $9,8 \times 10^{-11}$ e Log2 Fold change de 1,83, presente em 272 vestígios.

5.3.3.4 Diferenciação de género e idade do dador

Para a criação de um modelo de classificação com mais fatores foi também estudada a idade dos dadores dos vestígios em conjunto com o género. Os vestígios em estudo foram catalogados em 9 grupos distintos: G1 (18-25 anos), G2 (26-30 anos), G3 (31-35 anos), G4 (36-40 anos), G5 (41-45 anos), G6 (46-50 anos), G7 (51-55 anos), G8 (56-60 anos) e G9 (61-65 anos), bem como Feminino e Masculino para cada um dos grupos.

Na população utilizada neste estudo, a maioria dos aminoácidos têm predominância nos vestígios dos dadores do género masculino: fenilalanina, serina, ornitina, tirosina, isoleucina, ácido glutâmico, aspartato. Nos grupos do género feminino destacam-se a valina, a asparagina e a arginina.

A fenilalanina tem maior predominância no grupo M-G1, o que contrasta com a quase ausência deste aminoácido nos vestígios do grupo M-G9. Para o género feminino verifica-se que os grupos F-G4, F-G7, F-G8 e F-G9 não têm abundância significativa deste composto. A serina tem maior abundância nos grupos M-G1, M-G3 e M-G4. O grupo M-G9 apresenta uma abundância não significativa. Nos grupos femininos destaca-se o F-G2 – ver Figura 5.62.

5 Procedimento Experimental

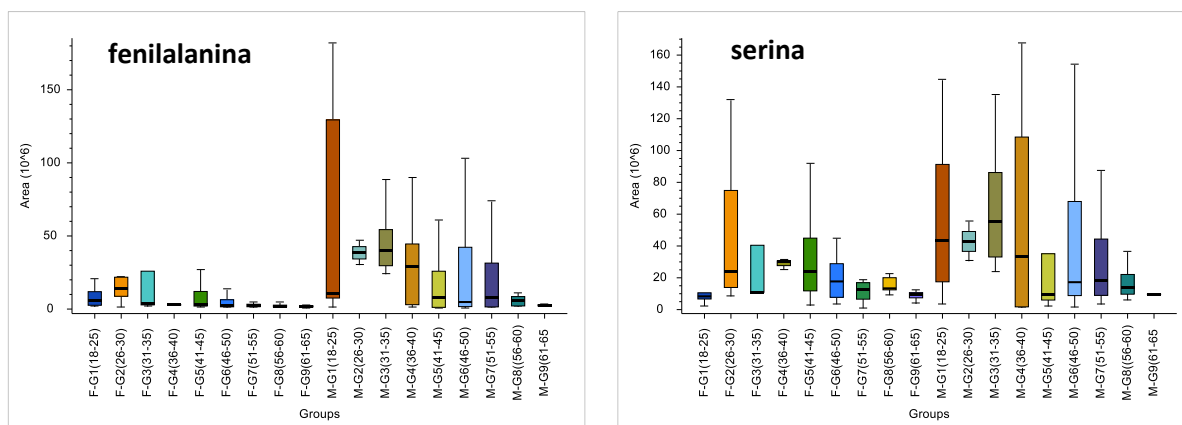


Figura 5.62 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos fenilalanina e serina nos diferentes grupos de gênero e etários.

O aminoácido alanina predomina nos grupos F-G1 e F-G2 em relação aos restantes grupos do gênero feminino. Nos grupos do gênero masculino destaca-se o M-G1. No grupo M-G2 a presença deste aminoácido não é significativa. Os vestígios das impressões digitais de ambos os gêneros e faixas etárias contêm prolina, porém a sua presença no grupo M-G2 não é significativa (Figura 5.63).

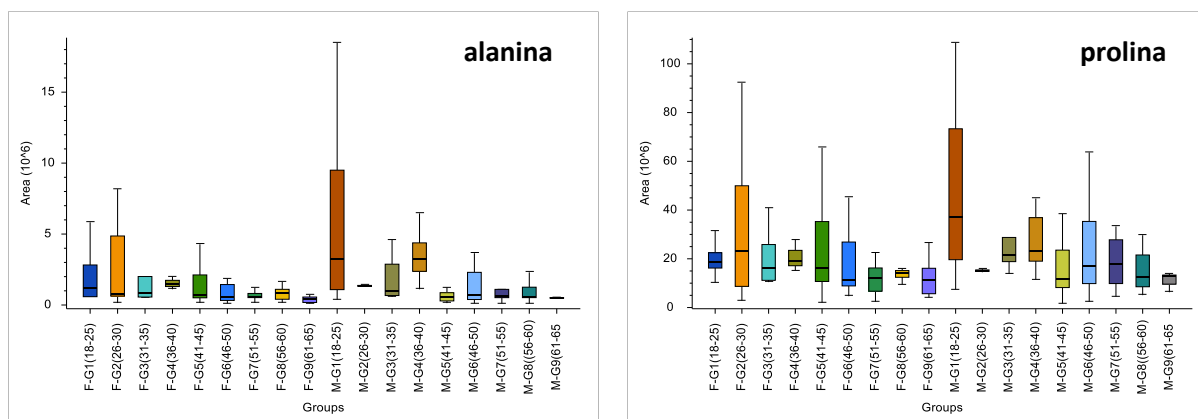


Figura 5.63 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos alanina e prolina nos diferentes grupos de gênero e etários.

O aminoácido ornitina apresenta uma predominância notória nos vestígios do gênero masculino, à exceção do grupo M-G9. Nos grupos femininos a sua presença destaca-se nos grupos F-G2 e F-G3. A tirosina apresenta um padrão semelhante à ornitina, com exceção dos grupos F-G1 e F-G2, principalmente (Figura 5.64).

5 Procedimento Experimental

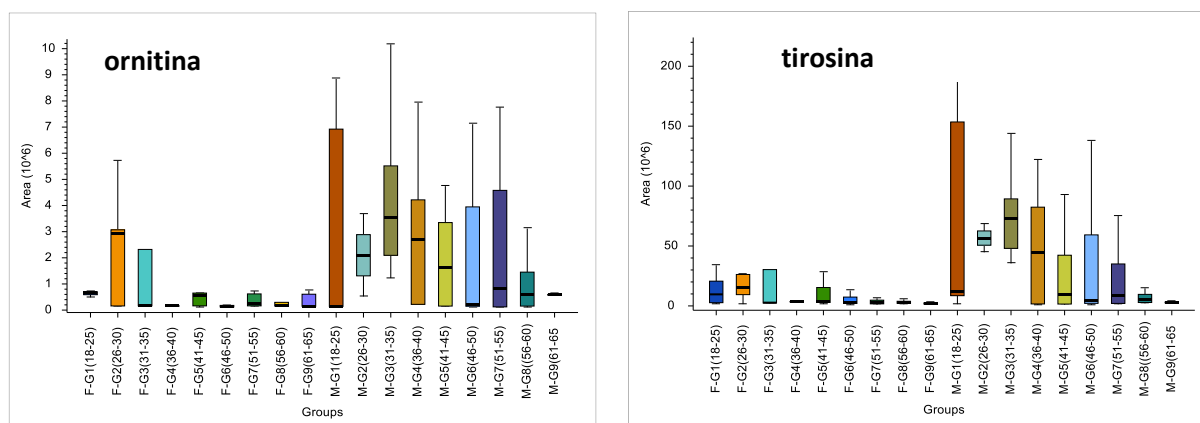


Figura 5.64 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos ornitina e tirosina nos diferentes grupos de gênero e etários.

Destaca-se a presença abundante do aminoácido valina nos grupos F-G5 e F-G8. A isoleucina predomina nos grupos do gênero masculino M-G1, M-G3, M-G4, M-G5, M-G6 e M-7. Nos grupos F-G4, F-G7, F-G8, F-G9 e M-G9 a quantidade deste aminoácido é insignificante ou nula (Figura 5.65).

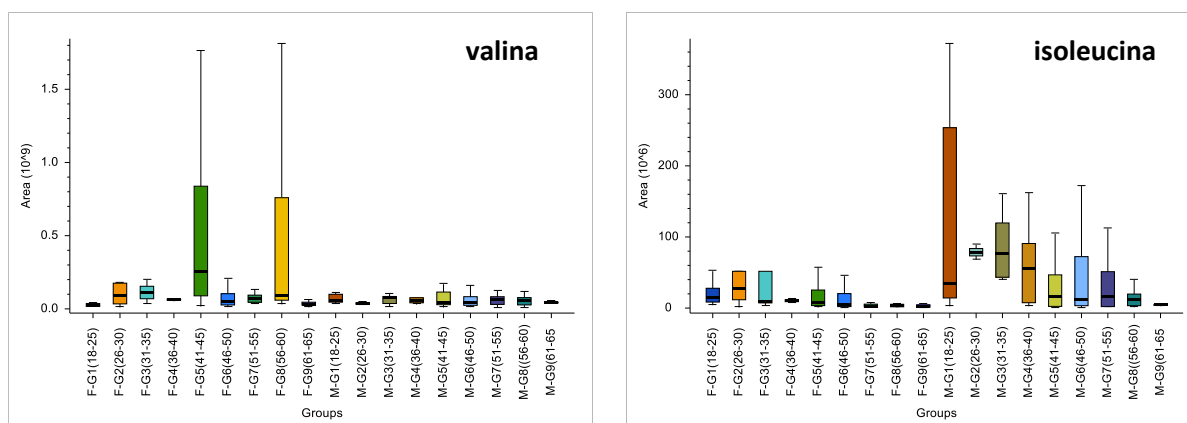


Figura 5.65 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos valina e isoleucina nos diferentes grupos de gênero e etários.

A presença do aminoácido asparagina apresenta uma grande variação nas faixas etárias estudadas, sendo a sua presença mais significativa nos grupos F-G6 e M-G1. Nos grupos M-G2, M-G3 e M-G4 a quantidade deste aminoácido é diminuta. A lisina é predominante nos grupos do gênero masculino de onde se destaca o grupo M-G1. Os grupos F-G1, F-G9 e M-G9 não apresentam uma quantidade significativa deste aminoácido (Figura 5.66).

5 Procedimento Experimental

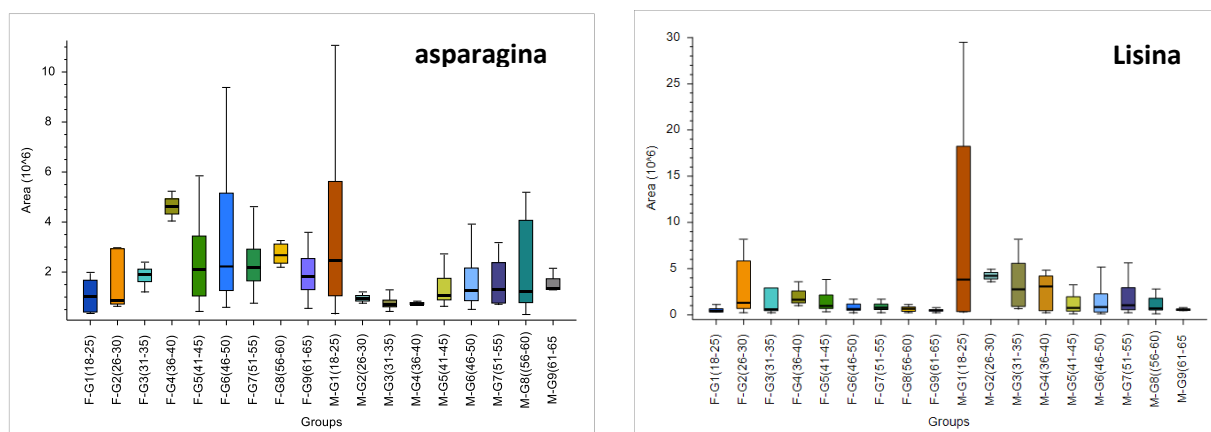


Figura 5.66 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos asparagina e lisina nos diferentes grupos de género e etários.

A maior abundância do aminoácido histidina regista-se nos vestígios do grupo F-G3. O ácido glutâmico tem maior significado nos grupos masculinos, de onde se destaca o M-G4. O grupo M-G9, mais uma vez, regista uma quantidade mínima ou nula deste aminoácido (Figura 5.67).

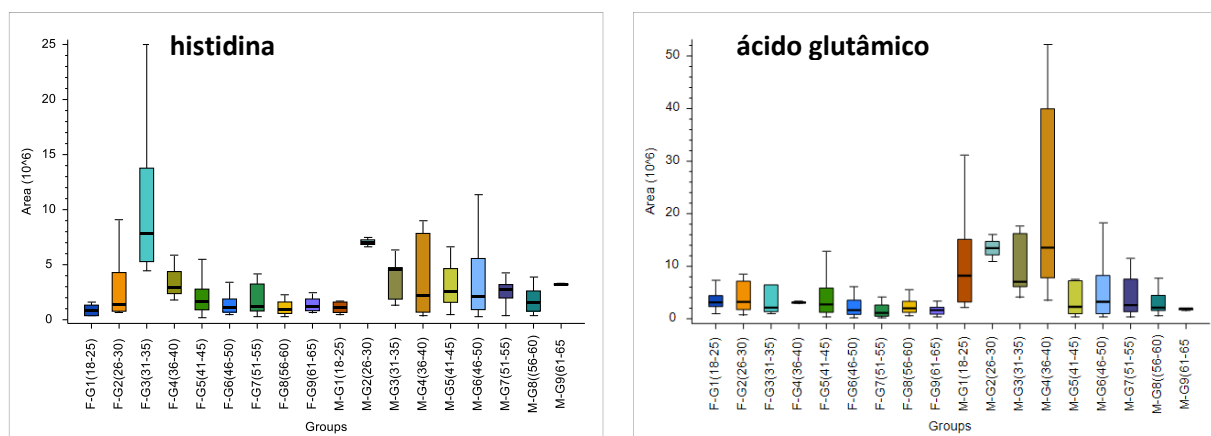


Figura 5.67 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos histidina e ácido glutâmico nos diferentes grupos de género e etários.

A arginina apresenta uma maior abundância nos grupos do género feminino, à exceção do F-G1. Nos grupos masculinos a sua presença é diminuta ou nula nos grupos M-G2, M-G3 e M-G4. O aminoácido aspartato apresenta alguma variação nas faixas etárias estudadas, contudo este é mais abundante no género masculino, com exceção do grupo M-G9 (Figura 5.68).

5 Procedimento Experimental

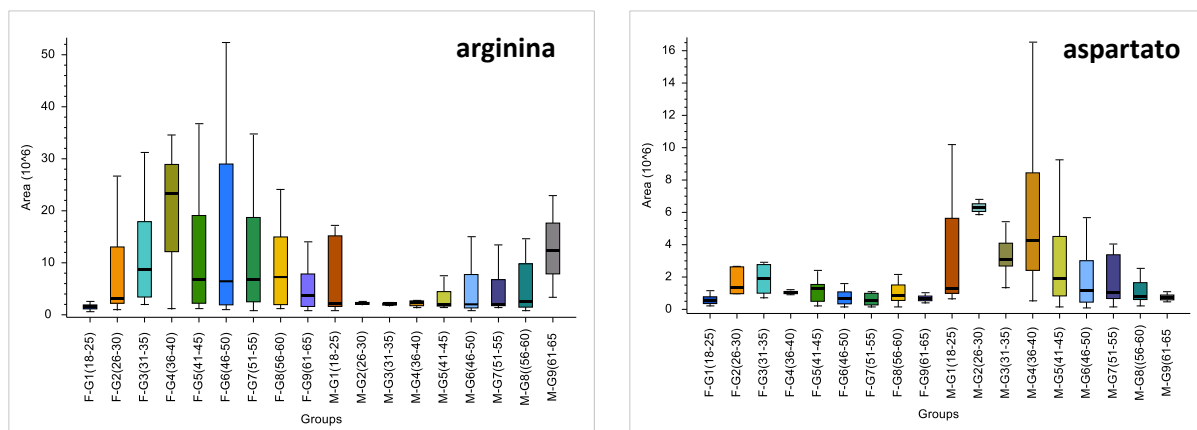
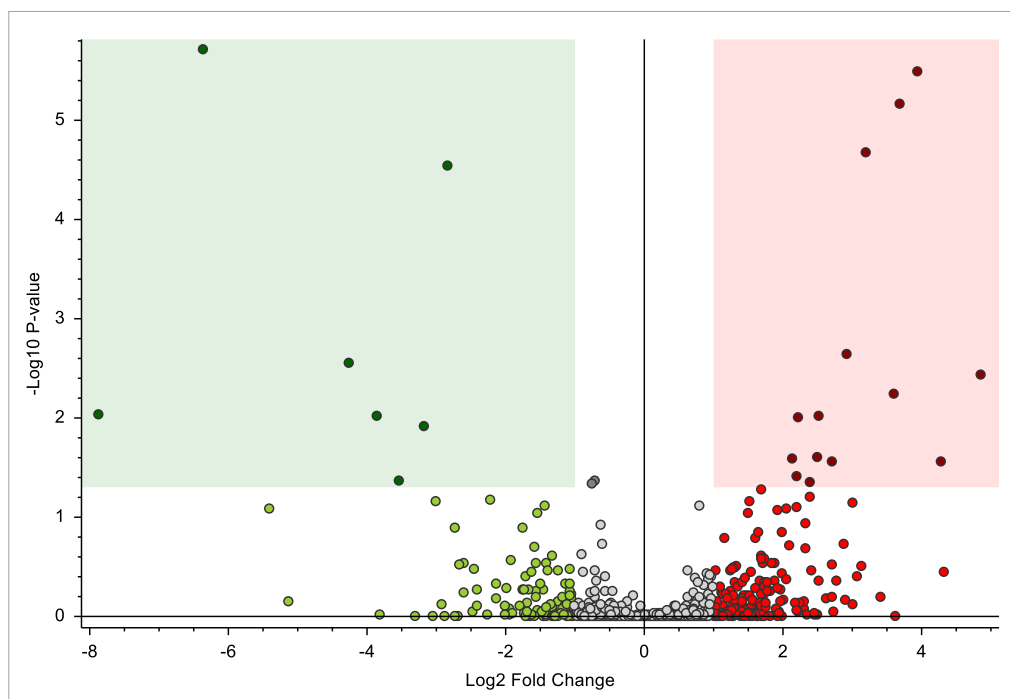


Figura 5.68 Gráficos representativos da abundância dos aminoácidos arginina e aspartato nos diferentes grupos de gênero e etários.

Com base na análise descritiva de cada composto por grupo de estudo, foram elaboradas tabelas com alguns compostos que em conjunto constituem um modelo de classificação das categorias aqui estudadas. A identificação dos compostos é putativa, tendo sido identificados com base no valor de m/z , distribuição isotópica e bases de dados. A identificação dos compostos característicos de cada grupo também foi efetuada através da análise diferencial ilustrada através de *Volcano plots*. Mostra-se, a título exemplificativo, o gráfico da análise diferencial para os grupos Feminino G4 (36-40) (FG4) e Feminino G5 (41-45) (FG5) na Figura 5.69.



As cores dos círculos significam: (1) cinza claro: ‘não significativo e não atinge o limite Log2 Fold Change’, (2) cinza escuro: ‘significativo e não atinge o limite Log2 Fold Change’, (3) verde claro: ‘não significativo e é menor do que o limite mínimo Log2 Fold Change’, (4) verde escuro: ‘significativo e é menor do que o limite mínimo Log2 Fold Change’, (5) vermelho claro: ‘não significativo e é maior do que o limite máximo Log2 Fold Change’ e (6) vermelho escuro: ‘significativo e é maior do que o limite máximo Log2 Fold Change’.

Figura 5.69 Volcano plot com um p-value de 0.05 e Log2 Fold Change de 1 para os grupos F-G4 e F-G5.

No grupo F-G1 (faixa etária dos 18 aos 25 anos para indivíduos do género feminino) –Tabela 5.21, constam as espécies químicas 4-hidroxibenzoato; ácido salicílico $[C_7H_5O_3]^-$, m/z 137,02457 detetado com um desvio de -0,32 ppm; nicotinamida, L-2,4-diaminobutanoato $[C_4H_{11}N_2O_2]^+$, m/z 119,08136 com um desvio de 1,29 ppm; 5-metil-3-pirazolamina $[C_4H_8N_3]^+$, m/z 98,07122 com um desvio de -1,34 ppm; creatinina, colina $[C_5H_{14}NO]^+$, m/z 104,10683 com um desvio de -1,56 ppm, ácido ciclohexanocarboxílico $[C_7H_{11}O_2]^-$, m/z 127,07639 com desvio de -0,49 ppm; tri-iso-propalolamina $[C_9H_{22}NO_3]^+$, m/z 192,15926 com desvio de -0,85 ppm; ácido palmitoleico; o-succinil-L-homoserina $[C_8H_{12}NO_6]^-$, m/z 218,06671 com desvio de -0,04 ppm e 3-dehidroesfinganina, com maior predominância em relação aos restantes grupos. O ácido fumárico quase não consta nos vestígios deste grupo. A colina, um nutriente essencial usualmente associado às vitaminas do complexo B, é também predominante nos grupos F-G3 e M-G2. Este nutriente também já foi detetado em vestígios de impressões digitais por fotometria de chama [28]. O composto o-succinil-L-homoserina é também predominante nos grupos F-G1, F-G2 e F-G3. No grupo dos vestígios de dadores masculinos regista-se a quase

ausência deste composto no grupo M-G9. Pela análise diferencial, a creatinina, detetada em 139 das amostras analisadas, apresenta *p-value* $7,8 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G2, *p-value* de $4,8 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo F-G3, *p-value* de $9,0 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G4, *p-value* de $6,6 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G5, *p-value* de $1,4 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G6, *p-value* de $2,7 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo FG-7, *p-value* de $1,5 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo F-G8 e $1,4 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G9. Assinala-se a negrito na Tabela 25 o composto com significado estatístico pela análise diferencial ANOVA.

Tabela 5.21 Compostos com maior predominância no Grupo F-G1.

F-G1 (18-25 anos)

4-hidroxibenzoato
 ácido salicílico
 nicotinamida
 L-2,4-diaminobutanoato
 5-metil-3-pirazolamina
creatinina
 colina
 ácido ciclohexanocarboxílico
 Tri-iso-propalolamina
 ácido palmitoleico
 o-succinil-L-homoserina
 3-dehidroesfinganina

No grupo F-G2 (faixa etária dos 26 aos 30 anos para indivíduos do género feminino) - Tabela 5.22 - constam as espécies químicas sulfato; testosterona-17-undecano $[C_{30}H_{49}O_3]^+$, m/z 457,36749 com desvio de 0,96 ppm; 4 α -14 α -dimetil-24-metileno-colest-8-en-3 β -ol $[C_{30}H_{51}O_2]^+$, m/z 443,38791 com desvio de 0,96 ppm; dietilmaleato $[C_8H_{11}O_4]^-$, m/z 171,06621 com desvio de -0,54 ppm; ácido ciclohexanocarboxílico; tri-iso-propalolamina; prolina; ácido 9-hidroxinonanóico $[C_9H_{17}O_3]^-$, m/z 173,11815 com desvio de -0,89 ppm; carnitina; prolinamida; ácido palmítoleico; o-succinil-L-homoserina; 3-dehidroesfinganina; (3E)-2-oxohex-3-enedioato $[C_6H_5O_5]^-$, m/z 157,01419 com um desvio de 0,55 ppm; 5 α -colest-8,24-dien-3-ona $[C_{27}H_{43}O]^+$, m/z 383,32965 com um desvio de 2,97 ppm e 4,4-dimetil-14 α -formil-5 α -colest-8-en-3 β -ol $[C_{30}H_{51}O_2]^+$, m/z 443,38791 com um desvio de 0,96 ppm, com maior predominância em relação aos restantes grupos. O (9S,10S)-9,10-dihidroioctadecanoato foi detetado sob a forma de ião negativo $[C_{18}H_{35}O_4]^-$, m/z 315,25385 com um desvio de -0,52 ppm e assinalado pela análise estatística diferencial com bastante significância de diferenciação em relação aos outros grupos do género feminino, ver também diagramas de caixa representados na Figura 5.70. Este composto apresenta um *p-value* de $3,4 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo F-G4, *p-*

value de $8,0 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G5, *p-value* de $6,2 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G6, *p-value* de $4,9 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo F-G7, $3,9 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo F-G8 e *p-value* $3,6 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo F-G9. O aminoácido serina apresenta um *p-value* de $2,4 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo do género masculino da mesma faixa etária. O ácido 2-oxooctadecanóico foi detetado sob a forma de ião negativo $[C_{18}H_{33}O_3]^-$, m/z 297,24356 com um desvio de 0,04 ppm apresenta *p-value* de $5,0 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo F-G4, *p-value* de $2,2 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G5, *p-value* de $1,7 \times 10^{-8}$ em relação ao grupo F-G6, *p-value* de $2,2 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G7, *p-value* de $1,1 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo F-G8 e *p-value* de $2,2 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G9. O ácido palmitoleico apenas apresenta um *p-value* de $4,8 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo F-G8. Assinalam-se a negrito na Tabela 5.22 os compostos com significado estatístico pela análise diferencial ANOVA.

Tabela 5.22 Compostos com maior predominância no Grupo F-G2.

F-G2 (26-30 anos)

sulfato
testosterona-17-undecano
ST dimetil ester 4 α -14 α -dimetil-24-metileno-colest-8-en-3 β -ol
dietilmaleato
Ácido ciclohexanocarboxílico
Tri-isso-propalolamina
prolina
ácido 9-hidroxinonanoico
carnitina
prolinamida
ácido palmitoleico
o-succinil-L-homoserina
3-dehidroesfinganina
(3E)-2-oxohex-3-enedioato
5 α -colest-8,24-dien-3-one
4,4 dimetil-14 α -formil-5 α -colest-8-en-3 β -ol
(9S,10S)-9,10-dihidroxiocetadecanoato
ácido 2-oxooctadecanóico

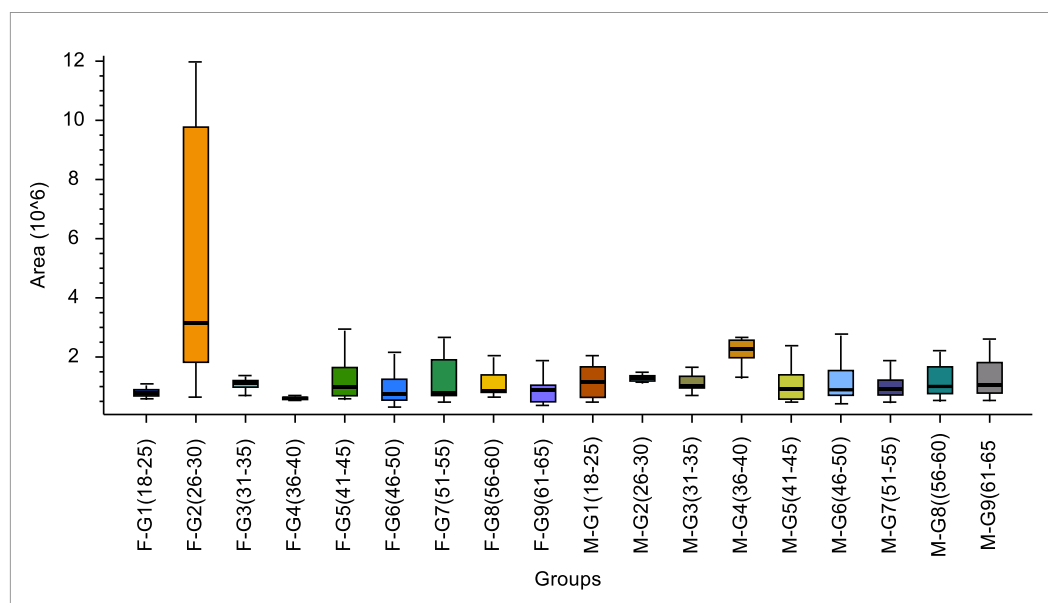


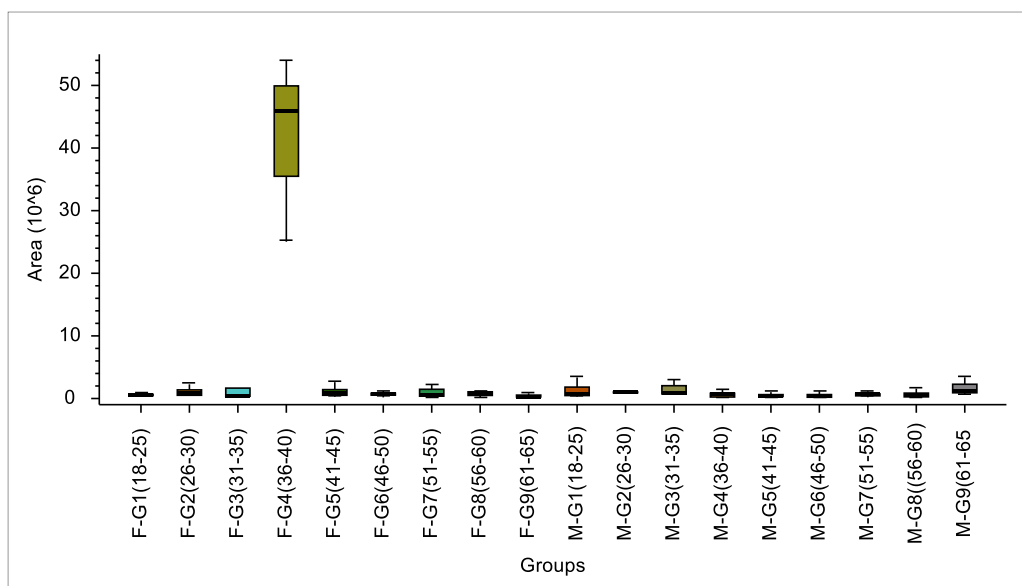
Figura 5.70 Diagramas de caixa representativos da abundância do (9S,10S)-9,10-dihidroioctadecanoato.

No grupo F-G3 (faixa etária dos 31 aos 35 anos para indivíduos do género feminino) – ver Tabela 5.23, constam as espécies químicas α,α -trehalose, *N*-acetil- β -meraminato (NeuAc) $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_9]^-$, m/z 308,09885 com um desvio de -0,57 ppm; mio-inositol; taurina; ácido 6-azida capróico $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_2]^+$, m/z 158,09204 com um desvio de -2,41 ppm ; sn-glicero-3-fosfocolina $[\text{C}_8\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{P}]^+$, m/z 258,10944 com um desvio de -2,58 ppm; prolina; o-succinil-L-homoserina e 3-dehidroesfinganina, com maior predominância em relação aos restantes grupos. Dos grupos dos vestígios respeitantes a dadores femininos, este é o que apresenta menor quantidade detetada de guanina. O NeuAc apresenta um p -value de $7,0 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo F-G5 e a taurina um p -value de $2,0 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo F-G7. Assinalam-se a negrito na Tabela 5.23 os compostos com significado estatístico pela análise diferencial ANOVA.

Tabela 5.23 Compostos com maior predominância no Grupo F-G3.

F-G3 (31-35 anos)
α,α -trehalose
N-acetil-β-meraminato (NeuAc)
mio-inositol
taurina
ácido 6-azida caproico
sn-glicero-3-fosfocolina
prolina
o-succinil-L-homoserina
3-dehidroesfinganina

Os grupos F-G4, F-G5 e F-G6 que englobam a faixa etária dos 36 aos 55 anos são muito semelhantes entre si, apenas se verificando a predominância da valina nos vestígios do grupo F-G5. Destaca-se no grupo F-G4 o composto $3\alpha,5\alpha$ -coleston-3-amina (Figura 5.71), detetado na sua forma protonada $[C_{27}H_{50}N]^+$, m/z 388,39243 com um desvio de -3,51 ppm. Este composto apresenta um valor de p -value de $6,3 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G1, p -value de $6,0 \times 10^{-8}$ em relação ao grupo F-G2, p -value de $4,4 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo F-G4, p -value de $4,6 \times 10^{-8}$ em relação ao grupo F-G5, p -value de $5,8 \times 10^{-11}$ em relação ao grupo F-G6, p -value de $1,6 \times 10^{-7}$ em relação ao grupo F-G7, p -value de $1,0 \times 10^{-8}$ em relação ao grupo F-G8 e p -value de $4,3 \times 10^{-12}$ em relação ao grupo F-G9.

**Figura 5.71** Diagramas de caixa representativos da abundância do $3\alpha,5\alpha$ -coleston-3-amina.

A predominância do ácido hidroxicitrico $[\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_8]^-$, m/z 207,01387 (desvio de -4,29 ppm) verifica-se em 89 vestígios dos grupos F-G5, F-G6, F-G7 e F-G8. O ácido gordo [FA amino (5:0)] ácido 2S-amino-pentanóico detetado sob a forma dos iões $[\text{C}_5\text{H}_{12}\text{NO}_2]^+$, m/z 118,08604; $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 140,06799; $[\text{M}+\text{K}]^+$, m/z 156,04190; $[2\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 235,16479; $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 257,14658 e $[2\text{M}+\text{K}]^+$, m/z 273,12039, é predominante no grupo F-G5 apresentando valores de *p-value* de $4,7 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo F-G6 e $2,3 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo F-G9. No grupo F-G8 (faixa etária dos 56 aos 60 anos para indivíduos do género feminino) constam as espécies químicas 4-hidroxibenzoato, ácido hidroxicitrico, ácido salicílico (ver, a título exemplificativo, os diagramas de caixa da Figura 5.72), valina, ácido 2-amino-4[(3-aminopropil) amino] butanóico $[\text{C}_7\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2]^+$, m/z 176,13914 com um desvio de 1,79 ppm, ver Tabela 5.24. O ácido salicílico apresenta um valor de *p-value* de $2,4 \times 10^{-4}$ na relação F-G8/F-G6, assinalado na referida tabela a negrito. Verifica-se que a 5-oxo-prolina $[\text{C}_5\text{H}_6\text{NO}_3]^+$, m/z 128,03522 com um desvio de -0,46 ppm tem menor incidência nos vestígios dos grupos F-G7, F-G8 e F-G9 que englobam a faixa etária dos 51 aos 65 anos. Refere-se, ainda, que a colina predomina no grupo F-G5 em relação ao grupo com a mesma faixa etária do género masculino, apresentando um *p-value* de $3,0 \times 10^{-4}$.

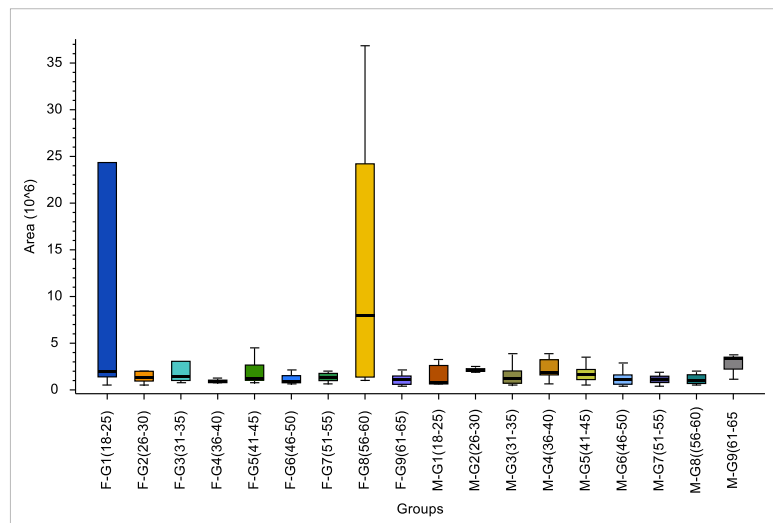


Figura 5.72 Gráfico representativo da abundância do ácido salicílico nos diferentes grupos de género e etários.

Tabela 5.24 Compostos com maior predominância no Grupo F-G8.**F-G8 (56-60 anos)**

4-hidroxibenzoato
 ácido hidroxicitrico
ácido salicílico
 valina
 ácido 2-amino-4[(3-aminopropil)amino] butanóico

No grupo M-G1 (faixa etária dos 18 aos 25 anos para indivíduos do género masculino) - ver Tabela 5.25, constam as espécies químicas lactato; alanina; fenilalanina; 1-hidroxi-2-oxo-1-fenilhidrazina $[C_6H_7N_2O_2]^+$, m/z 139,05011 com um desvio de -0,95 ppm; ácido 6-azida caproico; sn-glicero-3-fosfocolina; prolina; Gly-Phe; (R)-2,3-dihidroxi-e-metilbutanoato $[C_5H_9O_4]^-$, m/z 133,06049 com um desvio de -0,83 ppm e 2,3,4,5-tetrahidrodipicolinato $[C_7H_8NO_4]^-$, m/z 170,04584 com um desvio de -0,48 ppm.

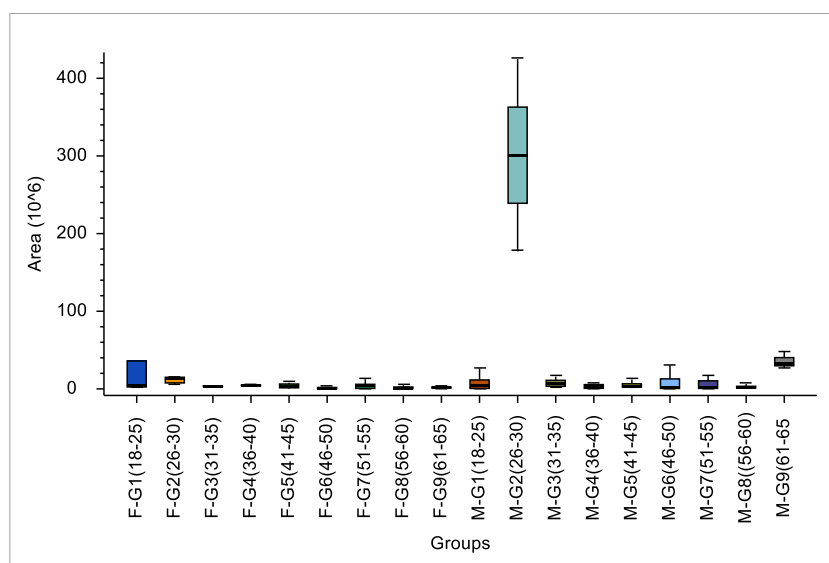
Tabela 5.25 Compostos com maior predominância no Grupo M-G1.**M-G1 (18-25 anos)**

lactato
 alanina
 fenilalanina
 1-hidroxi-2-oxo-1-fenilhidrazina
 ácido 6-azida caproico
 sn-glicero-3-fosfocolina
 prolina
 Gly-Phe
 (R)-2,3-dihidroxi-e-metilbutanoato
 2,3,4,5 -tetrahidrodipicolinato

No grupo M-G2 (faixa etária dos 26 aos 30 anos para indivíduos do género masculino) – ver Tabela 5.26 - constam as espécies químicas esfinganina; ácido 2-hidroxitricosanoico $[C_{23}H_{45}O_3]^-$, m/z 369,33713 com um desvio de 0,79; dietilmaleato; colina; fitoesfingosina; ácido 13-metil-tetradecanóico $[C_{15}H_{29}O_2]^-$, m/z 241,27756 com desvio de 1,00 ppm e acetolactato $[C_5H_7O_4]^-$, m/z 131,03496 com desvio de -0,82 ppm. De entre estes compostos, destaca-se a maior quantidade da esfinganina neste grupo (Figura 5.73).

Tabela 5.26 Compostos com maior predominância no Grupo M-G2.**M-G2 (26-30 anos)**

esfinganina
 ácido 2-hidroxitricosanoico
 dietilmaleato
 colina
 fitoesfingosina
 ácido 13-metil-tetradecanóico
 acetolactato

**Figura 5.73** Gráfico representativo da abundância da esfinganina nos vários grupos de estudo.

No grupo M-G3 (faixa etária dos 31 aos 35 anos para indivíduos do género masculino) – ver Tabela 5.27 - constam as espécies químicas triisopropanolamina; sn-glicero-3-fosfocolina; centrimónio, 4-[4-(dimetilamino)benzoi]l-8-metil-1-oxa-4,8-diazaspirol[4,5] decano-3-carboxílico e 4-hidroxibenzaldeído $[C_{18}H_{24}N_3O_4]^+$, m/z 346,17703 com um desvio de -0,48 ppm e 4-hidroxibenzaldeído. A sn-glicero-3-fosfocolina apresenta um valor de *p-value* de $8,0 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo M-G8 e *p-value* de $7,7 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo M-G6 – assinalada a negrito na Tabela 5.27.

Tabela 5.27 Compostos com maior predominância no Grupo M-G3.**M-G3 (31-35 anos)**

triisopropanolamina

sn-glicero-3-fosfocolina

centrimónio

4-[4-(dimetilamino)benzoil]-8-metil-1-oxa-4,8-diazaspiro [4,5] decano-3-carboxílico

4-hidroxibenzaldeído

No grupo M-G4 (faixa etária dos 36 aos 40 anos para indivíduos do género masculino) – ver Tabela 5.28 - constam as espécies químicas citrulina [$C_6H_{14}N_3O_3$]⁺, m/z 176,10269 com desvio de 1,40 ppm; creatina, L-2-amino-3-oxobutanoato [$C_4H_6NO_3$]⁻, m/z 116,03529 com um desvio de 0 ppm; triisopropinolamina; sn-glicero-3-fostocolina; 3-dehidrocarnitina [$C_7H_{12}NO_3$]⁻, m/z 158,08226 com um desvio de -0,23 ppm; ácido glutâmico e prolina. A N-acetil-L-citrulina [$C_8H_{14}N_3O_4$]⁻, m/z 2016,09909 com um desvio de 0,02 ppm, apresenta um *p-value* de $6,1 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo M-G5, *p-value* de $1,1 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo M-G6, *p-value* de $8,7 \times 10^{-4}$ em relação ao grupo M-G7 e *p-value* de $5,3 \times 10^{-3}$ em relação ao grupo M-G8. A N- α -acetilarginina [$C_8H_{17}N_4O_3$]⁺, m/z 217,12932 com um desvio de -1,24 ppm, apresenta *p-value* de $1,6 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo M-G5, *p-value* de $3,0 \times 10^{-9}$ em relação ao grupo M-G6, *p-value* de $8,5 \times 10^{-5}$ em relação ao grupo M-G7 e $6,7 \times 10^{-6}$ em relação ao grupo M-G8. Assinalam-se a negrito na Tabela 5.28 os compostos com significado estatístico pela análise diferencial ANOVA.

Tabela 5.28 Compostos com maior predominância no Grupo M-G4.**M-G4 (36-40 anos)**

citrulina

creatina

L-2-amino-3-oxobutanoato

triisopropinolamina

sn-glicero-3-fostocolina

3-dehidrocarnitina

ácido glutâmico

prolina

N-acetil-L-citrulina**N- α -acetilarginina**

Os grupos M-G5, M-G6 e M-G7 – ver Tabelas 5.29, 5.30 e 5.31 - que englobam a faixa etária dos 41 aos 55 anos apresentam poucos compostos diferenciadores. No grupo M-G5 destaca-se a predominância do ácido 9-hidroxinonanóico e no grupo M-G7 a sn-glicero-3-fostocolina. A colina, dentro dos grupos do género masculino é predominante no grupo M-G5, porém este

composto é mais predominante no grupo feminino dentro da mesma faixa etária com um *p-value* de $3,0 \times 10^{-4}$.

Tabela 5.29 Compostos com maior predominância no Grupo M-G5.

M-G5 (41-45 anos)
triisopropanolamina
prolina
ácido 9-hidroxinonanoico
colina

Tabela 5.30 Compostos com maior predominância no Grupo M-G6.

M-G6 (46-50 anos)
triisopropanolamina
prolina

Tabela 5.31 Compostos com maior predominância no Grupo M-G7.

M-G7 (51-55 anos)
sn-glicero-3-fostocolina
prolina

O grupo M-G8 que compreende as idades entre os 56 e os 60 anos apresenta como espécies químicas predominantes o triisopropanolamina, a citrulina e o derivado do colesterol 14α -dimetil-24-metileno-colest-8-en- 3β -ol.

No grupo M-G9, que engloba a faixa etária dos 61 aos 65 anos, apenas se destaca o ácido abscísico (Figura 5.74) com valores de *p-value* de $2,3 \times 10^{-13}$ em relação ao grupo M-G4, $1,6 \times 10^{-13}$ em relação ao grupo M-G5, $1,5 \times 10^{-13}$ em relação ao grupo M-G6, $1,6 \times 10^{-13}$ em relação ao grupo M-G7 e $1,7 \times 10^{-13}$ em relação ao grupo M-G8. De uma forma geral o *N*-acetilglutamato é predominante no género masculino, porém é quase ausente para este grupo.

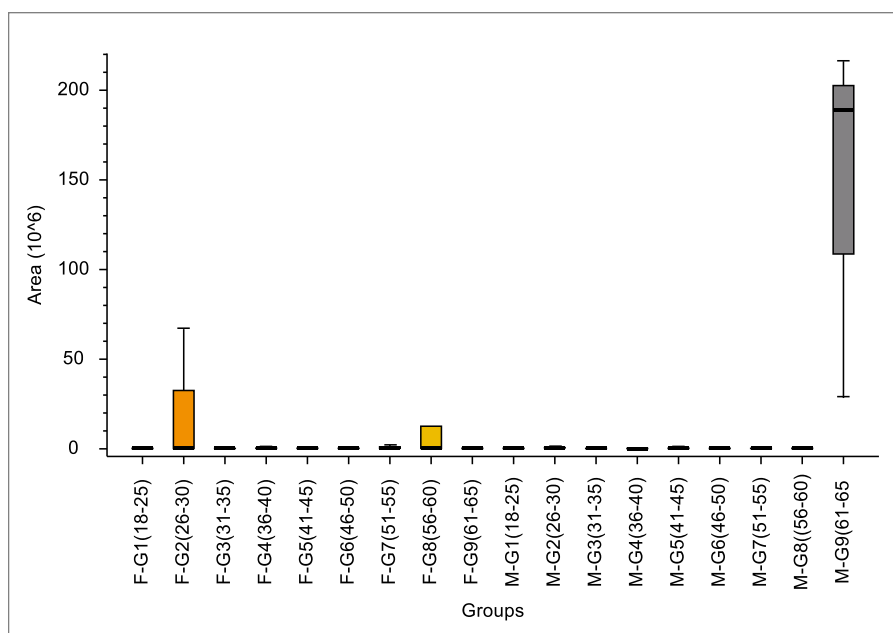


Figura 5.74 Diagramas de caixa representativos da abundância do ácido ascórbico.

5.3.3.5 Detecção de substâncias exógenas

Na população em estudo foram detetadas substâncias exógenas ou semi-exógenas. Medicamentos de uso comum como a aspirina, tramadol e paracetamol foram detetados na forma dos iões $[\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4]^-$ (m/z 179,03467, desvio 0,42 ppm); $[\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NO}_2]^+$ (m/z 264,19513, desvio -2,57 ppm) e $[\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2]^+$ (m/z 152,07033, desvio -2,04 ppm). Foi também detetada a presença de cloridrato de trazadona $[\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{ClN}_5\text{O}]^+$ (m/z 372,15689, desvio -2,99 ppm). Este composto é comumente usado no tratamento da depressão ou episódios de ansiedade. O composto bromo-3(4-metil-1,4-diazepan-1-y)-2-pirazinamina $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{BrO}_5]^-$ foi detetado num dador que faz tratamento para o glaucoma.

No que respeita a substâncias psicoativas, foi detetada a presença de cocaína e alguns dos seus derivados. A cocaína foi detetada sob a forma do ião positivo $[\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{NO}_4]^+$, a m/z 304,15219 com um desvio de -3,58 ppm. Este alcaloide foi confirmado por MS^2 – ver Figura 5.75. O espectro de massa MS^2 apresenta produtos de fragmentação característicos [340]: $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_2]^+$, m/z 182,11719 – fenacetina, pela perda de $\text{C}_6\text{H}_5\text{CO}_2$ (radical benzoato); $[\text{C}_9\text{H}_{12}\text{NO}]^+$, m/z 150,09097, pela perda de $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_3$ a partir do fragmento 182; $[\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}]^+$, m/z

105,03325, pela perda de $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3$; $[\text{C}_5\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 82,06495, pela perda de $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4$ a partir dos iões fragmento a m/z 304 ou 182.

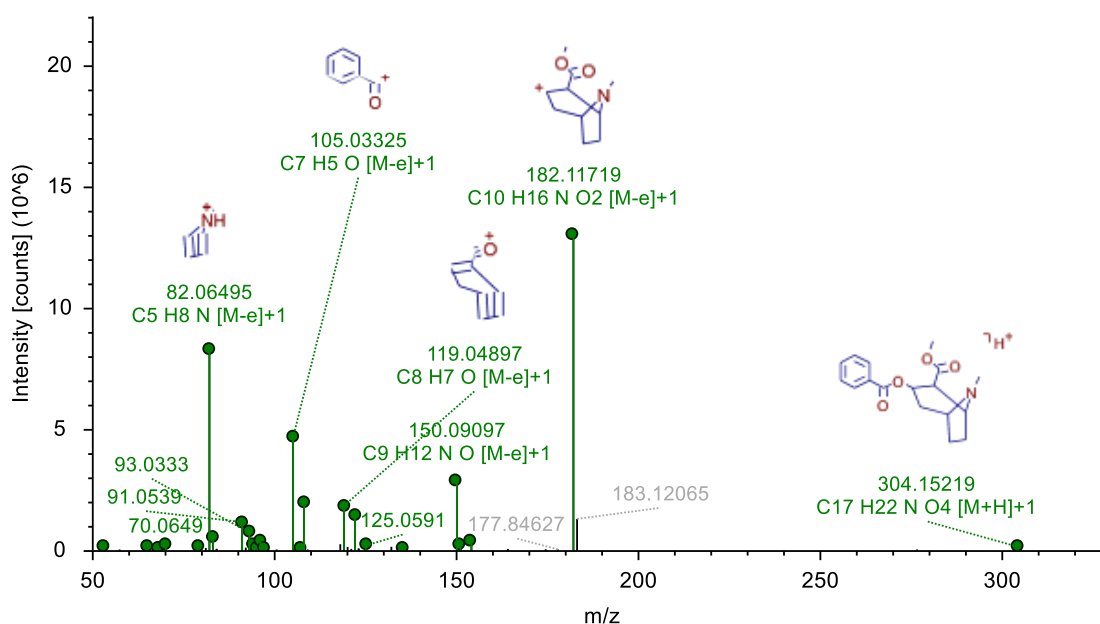


Figura 5.75 Espectro de massa MS² da cocaína.

Foram também detetados os compostos éster metílico anidroecgonina $[C_{10}H_{16}NO_2]^+$, m/z 182,11711 com um desvio de -2,43 ppm; éster metílico ecgonina $[C_{10}H_{18}NO_3]^+$, m/z 200,12755 com um desvio de -2,77 ppm e a norcocaína, detetada sob a forma protonada $[C_{16}H_{19}NO_4]^+$, m/z 290,13773 com um desvio de -3,40 ppm e com o aduto de sódio $[C_{10}H_{16}NO_2+Na]^+$, m/z 312,11975.

A benzoilecgonina e o éster metílico da ecgonina são os metabolitos mais abundantes em mais de 11 metabolitos da cocaína. A cocaína é convertida em benzoilecgonina e éster metílico da ecgonina principalmente por desesterificação (hidrólise) no fígado (Figura 5.76). A maioria dos outros metabolitos é farmacologicamente inativa ou tem atividade muito baixa. A norcocaína, através de um metabolismo oxidativo, é um dos poucos metabolitos que são farmacologicamente ativos. O éster metílico de anidroecgonina é formada a partir do fumo (pirólise) de cocaína. Quando cocaína e álcool são introduzidos no organismo, há uma mudança na via metabólica. Parte da cocaína, em vez de ser hidrolisada em compostos inativos, sofre transesterificação para um cocaetileno farmacologicamente ativo. O álcool interfere na desintoxicação da cocaína para benzoilecgonina e éster metílico da ecgonina, possivelmente pela inibição das esterases hepáticas, fazendo com que a cocaína permaneça no organismo por

um maior período de tempo. O álcool também é responsável pelo aumento da quantidade de norcocaína ativa produzida a partir do aumento da atividade de enzimas oxidativas no fígado.

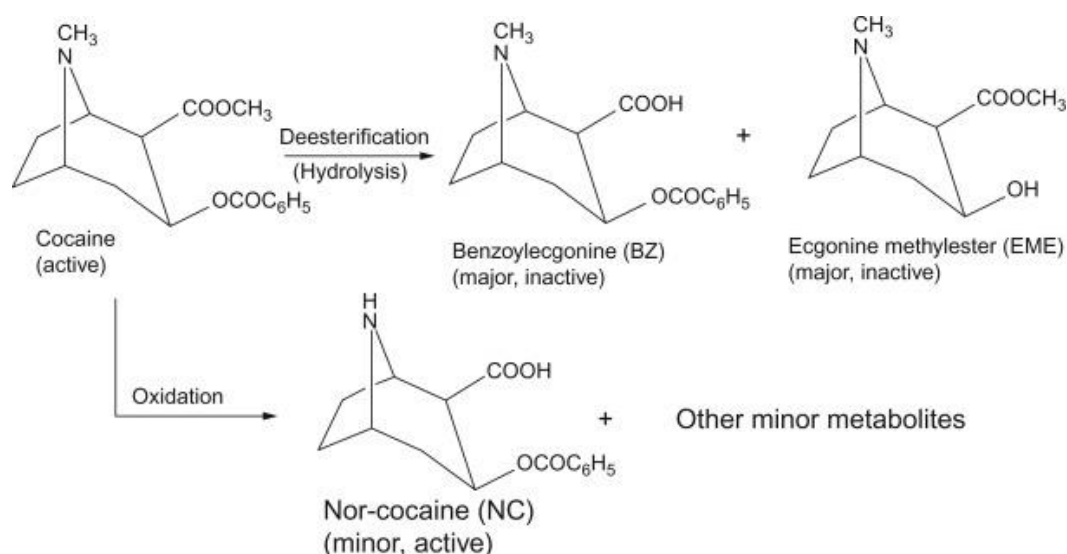


Figura 5.76 Esquema ilustrativo do metabolismo da cocaína que dá origem aos principais metabólitos [341].

Ainda no âmbito das substâncias psicoativas foi detetado o canabidiol (substância psicoativa encontrada na cannabis). Este composto foi identificado sob a forma protonada $[C_{21}H_{31}O_2]^+$, m/z 315,23090 com um desvio de -3,45 ppm. O ácido canabidiólico foi detetado sob a forma de íon negativo $[C_{22}H_{29}O_4]^-$, m/z 357,20734 com um desvio de 0,47 ppm. O espectro de massa MS^2 apresenta um padrão de fragmentação compatível com este composto, como se pode ver na Figura 5.77. Foram detetados os produtos de fragmentação $[C_{21}H_{29}O_2]^-$, m/z 313,21759; $[C_{21}H_{27}O_2]^-$, m/z 311,20221; $[C_{16}H_{19}O_2]^-$, m/z 243,14095; $[C_{15}H_{17}O_2]^-$, m/z 229,12581; $[C_{11}H_{15}O_2]^-$, m/z 179,10771 e $[C_9H_8O_2]^-$, m/z 148,05420.

5 Procedimento Experimental

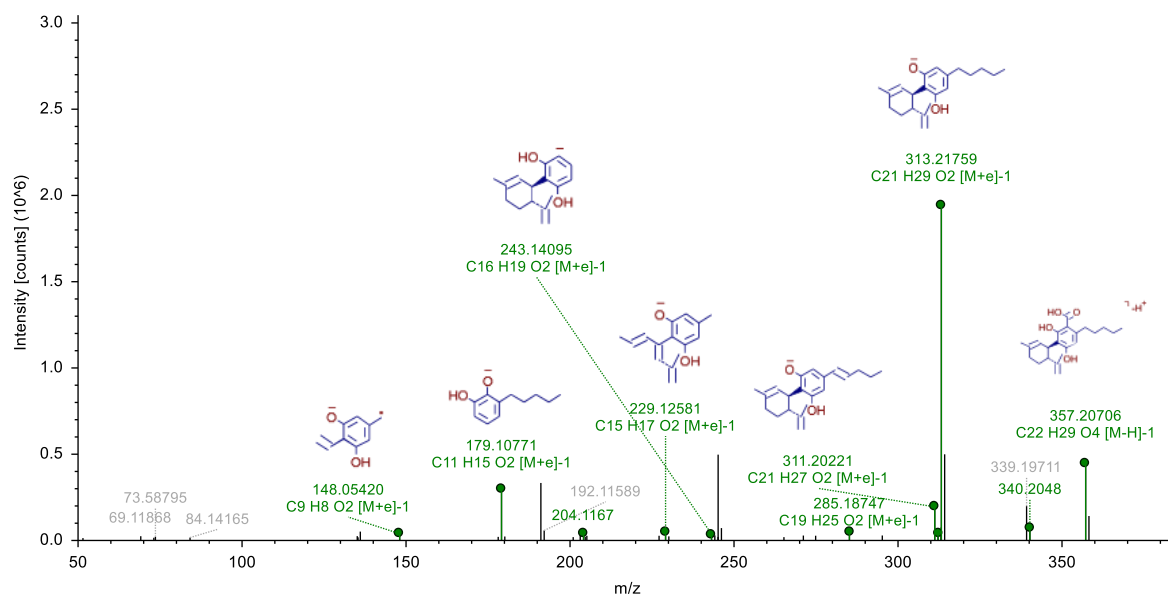


Figura 5.77 Espectro de massa MS² do ácido canabidiólico.

O canabidiol é um importante constituinte não psicotrópico da planta de cannabis e possui diversas atividades biológicas, incluindo efeito antiproliferativo nas células cancerígenas [342]. Este composto é obtido da descarboxilação não enzimática do ácido canabidiólico (Figura 5.78).

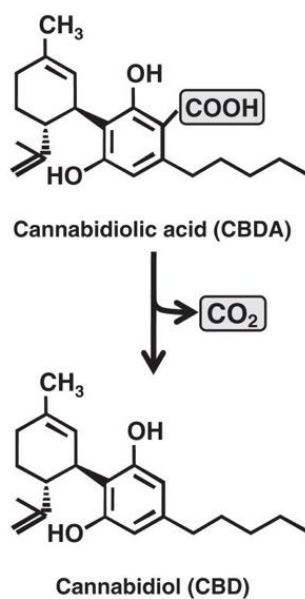


Figura 5.78 Esquema representativo da descarboxilação do ácido canabidiólico [342].

5 Procedimento Experimental

A nicotina foi detetada nos vestígios dos indivíduos fumadores sob a forma protonada $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{N}_2]^+$, m/z 163,12279 com um desvio de 0,78 ppm. No espectro de massa MS^2 – ver Figura 5.79 - foram detetados produtos de fragmentação característicos deste composto: $[\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}]^+$, m/z 132,08095; $[\text{C}_9\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 130,06511; $[\text{C}_7\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 106,06505; $[\text{C}_6\text{H}_6\text{N}]^+$, m/z 92,04946; $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}]^+$, m/z 84,08073; $[\text{C}_5\text{H}_6\text{N}]^+$, m/z 80,04943 e $[\text{C}_3\text{H}_8\text{N}]^+$, m/z 58,06531. Smyth e colaboradores [343] estudaram a nicotina por LC/ESI-MS, tendo referenciado como fragmentos característicos deste composto os iões a m/z 132, 130 e 106. Este composto também já foi detetado em impressões digitais [137], tendo sido o mais importante preditor da classificação dos vestígios de fumadores vs não fumadores. Foi referenciada a deteção dos produtos de degradação cotidina e hidroxipiridina, contudo no presente estudo tal não se verificou. A ausência destes compostos pode estar relacionada com a baixa concentração da cotidina segregada pelas glândulas écrinas, já a ausência de hidroxipiridina é explicada porque este é um produto de degradação microbiana.

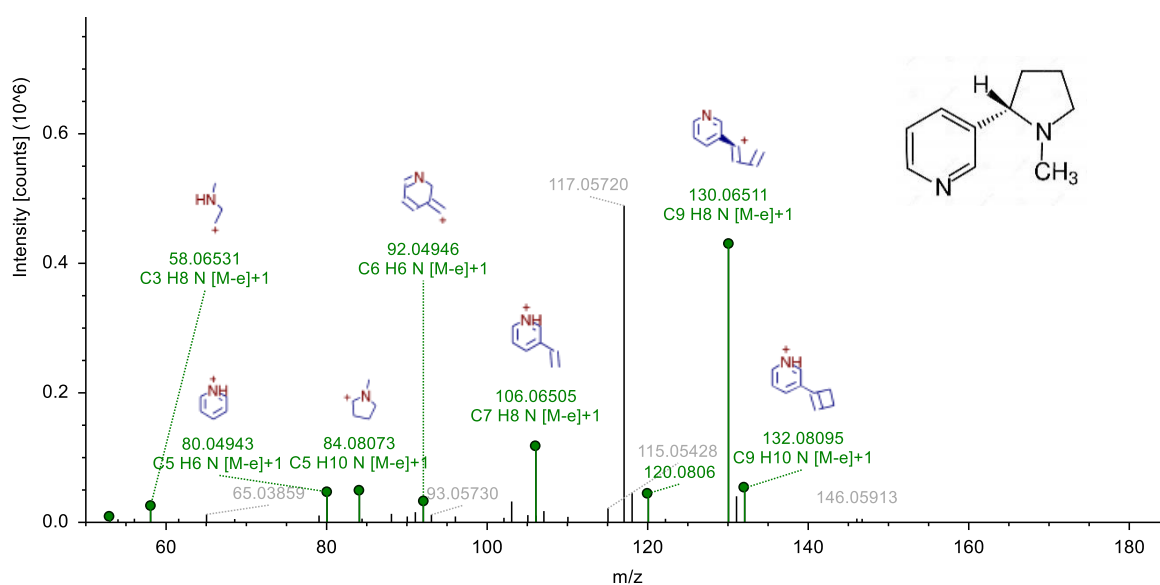


Figura 5.79 Espectro de massa MS^2 da nicotina.

No que diz respeito a produtos de higiene ou cosméticos, por exemplo, o triclosano foi detetado na forma de ião negativo $[\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Cl}_3\text{O}_2]^-$, m/z 286,94388 com desvio de 0,26 ppm. Este composto pertence ao grupo dos fenoxyfenóis policlorados. O ião didecildimetilamónio $[\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{N}]^+$, m/z 326,377750 com um desvio de -1,90 ppm é utilizado em desinfetantes. O surfactante éter monodecil trietileno glicol foi detetado na forma protonada $[\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{O}_4]^+$, m/z 319,28369 com um desvio de -1,89 ppm e na forma adutada com sódio (m/z 341,36650).

Também, neste âmbito foi detectado o dodeciltrimetil amónia na forma de ião protonado $[\text{C}_{15}\text{H}_{34}\text{N}]^+$, m/z 228,26796 com um desvio de -2,32 ppm. O pantenol, presente sobretudo em vestígios de dadores do género feminino, foi detectado na forma de ião positivo $[\text{C}_9\text{H}_{20}\text{NO}_4]^+$, 206,13805 com um desvio de -1,58 ppm. O sulfato de miristil foi detetado sob a forma de ião negativo $[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{O}_4\text{S}]^-$, m/z 293,17926 com um desvio de -0,18 ppm. Foi ainda possível detetar as espécies químicas PEG (polietileno glicóis) 4 a 6 e 10 a 14. Todos estes iões foram detetados na forma positiva: PEG4 $[\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_5]^+$, m/z 195,12219 com um desvio de 0,99 ppm; PEG 5 $[\text{C}_{10}\text{H}_{23}\text{O}_6]^+$, m/z 239,14857 com um desvio de -1,69 ppm e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z de 261,13049; PEG 6 $[\text{C}_{12}\text{H}_{27}\text{O}_7]^+$, m/z 283,17471 com um desvio de -1,73 ppm; PEG 10 $[\text{C}_{20}\text{H}_{43}\text{O}_{11} + \text{NH}_4]^+$, m/z 476,30560 com um desvio de -1,97 ppm; PEG 11 $[\text{C}_{22}\text{H}_{47}\text{O}_{12}]^+$, m/z 503,30295 com um desvio de -1,89 ppm e $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a m/z de 525,28790, $[\text{M}+\text{K}]^+$ a m/z de 539,16211. Os PEG 12 $[\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{O}_{13}]^+$ (m/z , 564,35828), 13 $[\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{O}_{14}]^+$ (m/z 608,38422) e 14 $[\text{C}_{28}\text{H}_{59}\text{O}_{15}]^+$ (m/z 652,41040) foram detetados com desvio superior a 5 ppm.

A ceramida 4 foi detetada, em maior abundância, em 9 dadores do género feminino com contacto recente com cremes. Este composto foi detetado na sua forma protonada $[\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{NO}_3]^+$ m/z 370,33105 com um desvio de -1,57 ppm, e também com perda de uma molécula de H_2O , a m/z 352,3208. Por outro lado, a dihidroceramida C2 foi detetada em 61 dos vestígios analisados. Foi detetada sob a forma protonada $[\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{NO}_3]^+$, m/z 344,31506 com um desvio de -1,52 ppm. No espectro de massa MS^2 para este ião, podemos observar os produtos de fragmentação $[\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{NO}]^+$, m/z 240,23180; $[\text{C}_8\text{H}_{13}]^+$, m/z 109,10123; $[\text{C}_7\text{H}_{11}]^+$, m/z 95,08545; $[\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, m/z 71,08549 e $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, m/z 57,07007 (Figura 5.80).

5 Procedimento Experimental

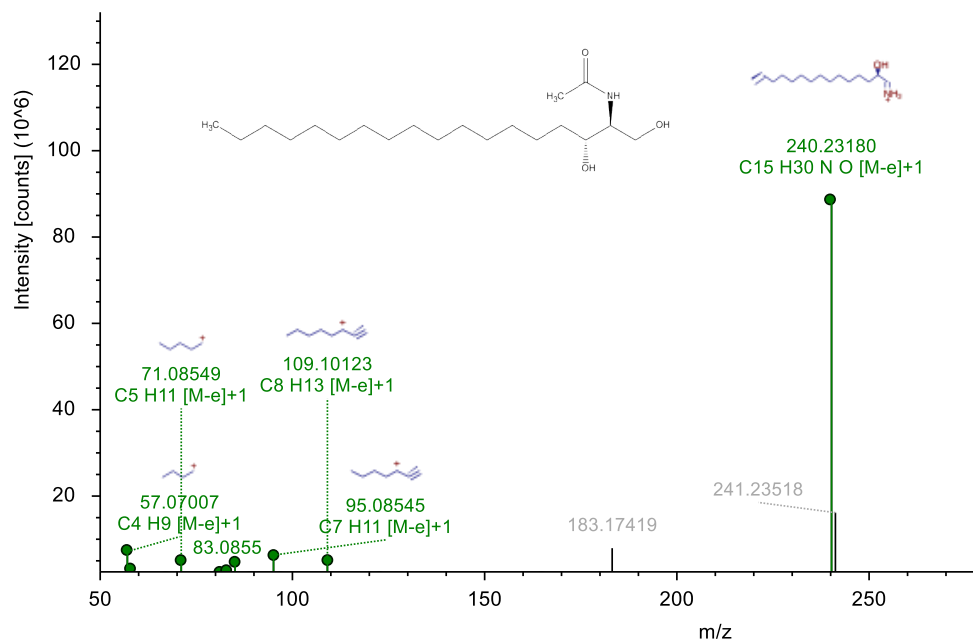


Figura 5.80 Espectro de massa da dihidroceramida C2.

As ceramidas participam na via biossintética mais importante para a criação de uma barreira epidérmica (Figura 5.81), pelo que são incorporadas em inúmeros produtos cosméticos.

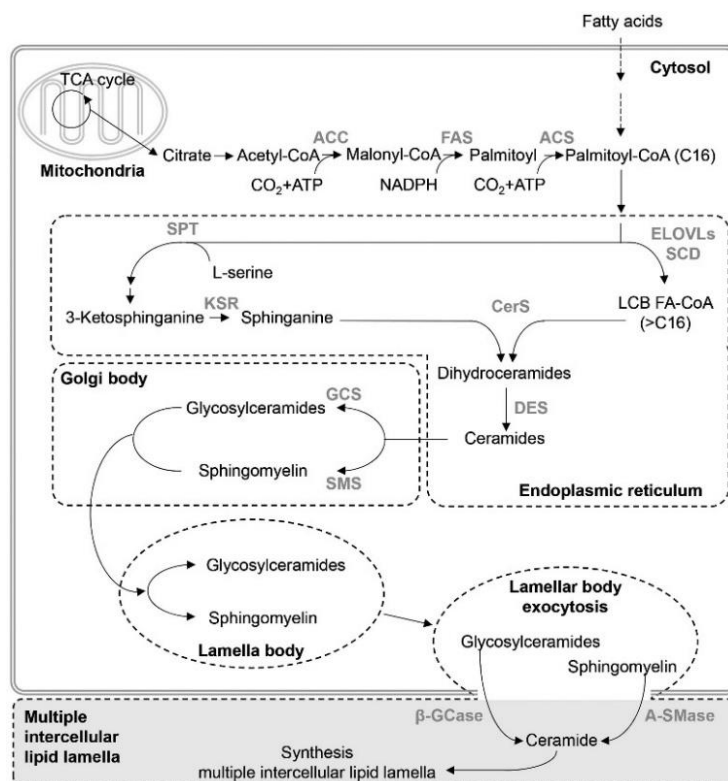


Figura 5.81 Síntese e transferência de ceramidas [344].

5 Procedimento Experimental

O ião $[\text{C}_{19}\text{H}_{42}\text{N}]^+$ (m/z 284,33057, desvio -2,04 ppm) foi atribuído ao composto centrimónio, comumente utilizado em produtos de higiene. Este ião foi detetado maioritariamente em vestígios de dados do género feminino.

O aditivo alimentar 3,5-di-ter-butilo-4-hidroxibenzoato de metilo foi detetado em inúmeros vestígios, e a cafeína foi identificada sob a forma do ião positivo $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_4\text{O}_2]^+$, m/z 195,08762 com um desvio de 0,42 ppm.

Capítulo 6

Conclusão e Trabalhos Futuros

6 CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Demonstrou-se a aplicabilidade da espectrometria de massa de ultra e alta resolução FT-ICR e Orbitrap com fonte de ionização por electrospray na análise de vestígios dermopapilares. Numa única análise são detetados milhares de espécies químicas de diferentes origens, permitindo identificar centenas de compostos, gerando deste modo informação extremamente valiosa que permitirá estabelecer uma assinatura química digital de determinada pessoa num determinado momento. A necessidade da utilização de métodos estatísticos para analisar e interpretar esta grande quantidade de informação é evidenciada através da observação deste conjunto de resultados. Os resultados obtidos das análises estatísticas evidenciam a capacidade analítica desta metodologia para a diferenciação do género.

Por FT-ICR foram detetados 140 lípidos correspondentes a 11 sub-classes de FA, 6 sub-classes PR, 17 sub-classes ST, 12 sub-classes PK, 2 sub-classes SP, 19 sub-classes GP e 1 Sub-classe GL, perfazendo um total de 68 sub-classes. Até agora nenhuma das tecnologias utilizadas neste tipo de abordagem havia permitido a deteção de tantas sub-classes de lípidos em vestígios de impressões digitais como as que foram conseguidas no presente trabalho através desta metodologia.

Os padrões espectrais obtidos por esta técnica associados à massa exacta e informação obtida com o uso de CID permitiram identificar inequivocamente o explosivo TATP em todas as sínteses em estudo e nas impressões digitais contaminadas com este explosivo. Numa só análise foram detetados os peróxidos oligoméricos adutados com sódio, potássio e amónio formados nas sínteses do TATP, característicos deste explosivo. Os espectros de massa obtidos com esta técnica permitiram a sua associação com o ácido catalisador utilizado em cada uma das sínteses. Esta técnica permitiu também identificar o TATP e inferir sobre qual o ácido catalisador utilizado, em impressões digitais cuja matriz espectral é bastante complexa dada a informação que ela contém.

Em particular, no último ano do trabalho da tese foi implementada no Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária uma metodologia “HILIC-Orbitrap” e um *workflow* de análise que visa a construção de um sistema de classificação para a identificação do género com base na informação química contida nos vestígios dermopapilares, bem como a deteção de substâncias exógenas, nomeadamente medicamentos e drogas de abuso.

Através da análise de amostras de 99 indivíduos, 46 do género feminino e 53 do género masculino, com idades compreendidas entre os 19 e os 63 anos, esta metodologia permitiu a identificação de cerca de 60 metabolitos. Foram identificados 15 aminoácidos (7 essenciais e 8 não essenciais), bem como alguns dipéptidos e lípidos. A análise da intra-variabilidade mostrou, a título exemplificativo, a grande variação na deteção de metabolitos neste tipo de vestígios.

O *workflow* de interpretação de dados permitiu construir listas de biomarcadores para a diferenciação de género do dador dos vestígios das impressões digitais. Constatou-se uma maior variação na composição química nos vestígios de origem feminina. Os resultados obtidos permitiram concluir que os vestígios de origem masculina têm uma maior abundância em aminoácidos, bem como noutros metabolitos listados. A ferramenta estatística ANOVA permitiu associar um valor de probabilidade a cada composto integrante das listas de diferenciação. Esta informação permitirá a construção de um modelo de classificação para a determinação do género do dador da impressão digital.

Com esta população de estudo foi também efetuada a diferenciação por género/idade do dador. A população de estudo foi dividida em 9 grupos etários por género: G1 (18-25 anos), G2 (26-30 anos), G3 (31-35 anos), G4 (36-40 anos), G5 (41-45 anos), G6 (46-50 anos), G7 (51-55 anos), G8 (56-60 anos) e G9 (61-65 anos). A diferenciação de género foi, mais uma vez, evidenciada, sobretudo pela forte abundância dos aminoácidos nos vestígios do género masculino. Nos referidos grupos etários foi possível identificar compostos diferenciadores que irão permitir a classificação do vestígio.

No que concerne à deteção de substâncias exógenas, foi possível identificar fármacos, drogas de abuso, substâncias utilizadas em produtos de higiene pessoal/cosméticos e aditivos alimentares.

Em trabalhos futuros pretende-se, numa primeira etapa, alargar ainda mais a população de estudo para obter uma mais completa lista de compostos diferenciadores de género e idade do dador. A construção de um modelo de classificação de características do dador (género e idade) será também um dos objetivos. Este modelo de classificação poderá ser baseado em ferramentas de *machine learning*. Estudos posteriores de âmbito operacional em cooperação com os setores do Local do Crime e Lofoscopia do Laboratório de Polícia Científica serão efetuados.

Capítulo 7

Referências Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] (2012) *The Fingerprint Sourcebook*; McRoberts, A., Ed.; U.S. Department of Justice Office of Justice Programs: Washington; Vol. 19.
- [2] Pina, L. de.(1938) *Dactiloscopia (Identificação – Polícia Científica)*; Livraria Bertrand: Lisboa.
- [3] Lennard, C. J.; Margot, P. A.; Stoilovic, M.; Warrenner, R. N.(1986) Synthesis of Ninhydrin Analogues and Their Application to Fingerprint Development: Preliminary Results. *J. Forensic Sci. Soc.* 26 (5), 323–328. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(86\)72510-3](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(86)72510-3).
- [4] Araújo, A. P. de.(1960) *Manual de Dactiloscopia*, 2ª edição.; Escola de Polícia de São Paulo, Ed.; São Paulo.
- [5] Simas, A.; Calisto, F.(1999) *Metodologias de Investigação Criminal*; Instituto Nacional de Polícia e Ciências Criminais, Centro de Recursos Didáticos e Audiovisuais: Lisboa.
- [6] Simas, A.; Calisto, F.; Calado, F.(2002) *Dactiloscopia e Inspeção Lofoscópica*; Sector de Identificação Judiciária, Polícia Judiciária: Lisboa.
- [7] Finger Prints by Francis Galton <http://galton.org/books/finger-prints/> (accessed Jun 25, 2020).
- [8] Interpol. Interpol <http://www.interpol.int/> (accessed Feb 23, 2018).
- [9] C. Champod, C, Lennard, P. Margot, M. S.(2004) *Fingerprints and Other Ridge Skin Impressions*; CRC Press, Ed.; CRC Press: Boca Raton, London, New York. Washington D.C.
- [10] Becue, A.; Egli, N.; Champod, C.; Margot, P. A.; Champod, C.(2010) Fingermarks and Other Impressions Left by the Human Body. *16th Int. Forensic Sci. Symp. Interpol--Lyon 5 th-8 th Oct. 2010 Rev. Pap.* 609 (August 2007).
- [11] Jasuja, O. P.; Toofany, M. A.; Singh, G.; Sodhi, G. S.(2009) Dynamics of Latent Fingerprints: The Effect of Physical Factors on Quality of Ninhydrin Developed Prints - A Preliminary Study. *Sci. Justice* 49 (1), 8–11. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.08.001>.
- [12] Yang, R.; Lian, J.(2014) Studies on the Development of Latent Fingerprints by the Method of Solid-Medium Ninhydrin. *Forensic Sci. Int.* 242, 123–126. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.036>.
- [13] Stoilovic, M.(1993) Improved Method for DFO Development of Latent Fingerprints. *Forensic Sci. Int.* 60 (3), 141–153. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(93\)90233-Z](https://doi.org/10.1016/0379-0738(93)90233-Z).
- [14] D’Elia, V.; Materazzi, S.; Iuliano, G.; Niola, L.(2015) Evaluation and Comparison of 1,2-Indanedione and 1,8-Diazafluoren-9-One Solutions for the Enhancement of Latent Fingerprints on Porous Surfaces. *Forensic Sci. Int.* 254, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.036>.
- [15] Sodhi, G. S.; Kaur, J.(2016) Physical Developer Method for Detection of Latent Fingerprints: A Review. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. Egyptian Forensic Medicine Authority 2016, pp 44–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2015.05.001>.

- [16] Stauffer, E.; Becue, A.; Singh, K. V.; Thampi, K. R.; Champod, C.; Margot, P.(2007) Single-Metal Deposition (SMD) as a Latent Fingermark Enhancement Technique: An Alternative to Multimetal Deposition (MMD). *Forensic Sci. Int.* 168 (1), e5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.12.009>.
- [17] Becue, A.; Scoundrianos, A.; Moret, S.(2012) Detection of Fingermarks by Colloidal Gold (MMD/SMD) - beyond the PH 3 Limit. *Forensic Sci. Int.* 219 (1–3), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.11.024>.
- [18] Newland, T. G.; Moret, S.; Bécue, A.; Lewis, S. W.(2016) Further Investigations into the Single Metal Deposition (SMD II) Technique for the Detection of Latent Fingermarks. *Forensic Sci. Int.* 268, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.09.004>.
- [19] King, R. S. P.; Hallett, P. M.; Foster, D.(2015) Seeing into the Infrared: A Novel IR Fluorescent Fingerprint Powder. *Forensic Sci. Int.* 249, e21–e26. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.01.020>.
- [20] Barros, H. L.; Stefani, V.(2019) Micro-Structured Fluorescent Powders for Detecting Latent Fingerprints on Different Types of Surfaces. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 368, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.09.046>.
- [21] Jasuja, O. P.; Singh, G. D.; Sodhi, G. S.(2008) Small Particle Reagents: Development of Fluorescent Variants. *Sci. Justice* 48 (3), 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.04.002>.
- [22] Cucè, P.; Polimeni, G.; Lazzaro, A. P.; De Fulvio, G.(2004) Small Particle Reagents Technique Can Help to Point out Wet Latent Fingerprints. *Forensic Sci. Int.* 146 (SUPPL.), S7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.005>.
- [23] Rohatgi, R.; Sodhi, G. S.; Kapoor, A. K.(2015) Small Particle Reagent Based on Crystal Violet Dye for Developing Latent Fingerprints on Non-Porous Wet Surfaces. *Egypt. J. Forensic Sci.* 5 (4), 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejfs.2014.08.005>.
- [24] Bumrah, G. S.(2017) Cyanoacrylate Fuming Method for Detection of Latent Fingermarks: A Review. *Egypt. J. Forensic Sci.* 7 (1). <https://doi.org/10.1186/s41935-017-0009-7>.
- [25] Jones, N.; Stoilovic, M.; Lennard, C.; Roux, C.(2001) Vacuum Metal Deposition: Developing Latent Fingerprints on Polyethylene Substrates after the Deposition of Excess Gold. *Forensic Sci. Int.* 123 (1), 5–12. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00507-2](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00507-2).
- [26] Yu, I. H.; Jou, S.; Chen, C. M.; Wang, K. C.; Pang, L. J.; Liao, J. S.(2011) Development of Latent Fingerprint by ZnO Deposition. *Forensic Sci. Int.* 207 (1–3), 14–18. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.035>.
- [27] Davis, L. W. L.; Kelly, P. F.; King, R. S. P.; Bleay, S. M.(2016) Visualisation of Latent Fingermarks on Polymer Banknotes Using Copper Vacuum Metal Deposition: A Preliminary Study. *Forensic Sci. Int.* 266, e86–e92. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.05.037>.
- [28] Dalglish, T.; Williams, J. M. G. ; Golden, A.-M. J.; Perkins, N.; Barrett, L. F.; Barnard, P. J.; Au Yeung, C.; Murphy, V.; Elward, R.; Tchanturia, K.; Watkins, E.(2007) *Advances in Fingerprint Technology*, Second Edi.; Lee, H. C., Gaensslen, R. E., Eds.; CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C.: Boca Raton; Vol. 136.
- [29] Hadorn, B.; Hanimann, F.; Anders, P.; Curtius, H. C.; Halverson, R.(1967) Free Amino-

- Acids in Human Sweat from Different Parts of the Body. *Nature*. 1967, pp 416–417. <https://doi.org/10.1038/215416a0>.
- [30] Jelly, R.; Patton, E. L. T.; Lennard, C.; Lewis, S. W.; Lim, K. F.(2009) The Detection of Latent Fingermarks on Porous Surfaces Using Amino Acid Sensitive Reagents: A Review. *Analytica Chimica Acta*. October 12, 2009, pp 128–142. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.023>.
- [31] Rothman, S.; Sullivan, M. B.(1949) Amino Acids on the Normal Skin Surface. *J. Invest. Dermatol.* 13 (6). <https://doi.org/10.1038/jid.1949.104>.
- [32] Croxton, R. S.; Baron, M. G.; Butler, D.; Kent, T.; Sears, V. G.(2010) Variation in Amino Acid and Lipid Composition of Latent Fingerprints. *Forensic Sci. Int.* 199 (1–3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.019>.
- [33] Lennard, C. J.; Margot, P. A.; Stoilovic, M.; Warrenner, R. N.(1988) Synthesis and Evaluation of Ninhydrin Analogues as Reagents for the Development of Latent Fingerprints on Paper Surfaces. *J. Forensic Sci. Soc.* 28 (1), 3–23. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(88\)72799-1](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(88)72799-1).
- [34] Joullié, M. M.; Thompson, T. R.; Nemeroff, N. H.(1991) Ninhydrin and Ninhydrin Analogs. Syntheses and Applications. *Tetrahedron* 47 (42), 8791–8830. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)80997-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)80997-2).
- [35] Hark, R. R.; Hauze, D. B.; Petrovskaia, O.; Joullié, M. M.(2001) Synthetic Studies of Novel Ninhydrin Analogs. *Can. J. Chem.* 79 (11), 1632–1654. <https://doi.org/10.1139/v01-143>.
- [36] Pounds, C. A.; Grigg, R.; Mongkolaussavaratana, T.(1990) The Use of 1,8-Diazafluoren-9-One (DFO) for the Fluorescent Detection of Latent Fingerprints on Paper. A Preliminary Evaluation. *J. Forensic Sci.* 35 (1), 12813J. <https://doi.org/10.1520/jfs12813j>.
- [37] Wilkinson, D.(2000) Study of the Reaction Mechanism of 1,8-Diazafluoren-9-One with the Amino Acid, L-Alanine. *Forensic Sci. Int.* 109 (2), 87–103. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00219-4](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00219-4).
- [38] Pearson, E. F.(1984) Latent Fingerprints: A Review of Their Origin, Composition and Methods for Detection. *Forensic Sci. Int.* 25 (2), 156–157. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(84\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0379-0738(84)90026-4).
- [39] Cantu, A. A.(2001) Silver Physical Developers for the Visualization of Latent Prints on Paper. *Forensic Sci. Rev.* 13 (1), 29–64.
- [40] FRENS, G.(1973) Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nat. Phys. Sci.* 241 (105), 20–22. <https://doi.org/10.1038/physci241020a0>.
- [41] Schnetz, B.; Margot, P.(2001) Technical Note: Latent Fingermarks, Colloidal Gold and Multimetal Deposition (MMD) Optimisation of the Method. *Forensic Sci. Int.* 118 (1), 21–28. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(00\)00361-3](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(00)00361-3).
- [42] Becue, A.; Scoundrianos, A.; Champod, C.; Margot, P.(2008) Fingermark Detection Based on the in Situ Growth of Luminescent Nanoparticles-Towards a New Generation of Multimetal Deposition. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.04.008>.
- [43] Sodhi, G. S.; Kaur, J.(2001) Powder Method for Detecting Latent Fingerprints: A Review. *Forensic Sci. Int.* 120 (3), 172–176. <https://doi.org/10.1016/S0379->

- 0738(00)00465-5.
- [44] (2001) *Advances in Fingerprint Technology*, Second Edi.; Lee, H. C., Gaenssle, R. E., Eds.; CRC Press Boca Raton London New York Washington, D.C.: London.
 - [45] Woods, J.; Guthrie, J.; Rooney, J.; Kelly, L.; Doyle, A.; Noonan, E.(1989) Vapour Deposition of Poly(Alkyl-2-Cyanoacrylate) Resist Coatings: A New Electron-Beam/Deep-Ultra-Violet Photoresist Technology. In *Polymer*; Vol. 30, pp 1091–1098. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(89\)90086-4](https://doi.org/10.1016/0032-3861(89)90086-4).
 - [46] Czekanski, P.; Fasola, M.; Allison, J.(2006) A Mechanistic Model for the Superglue Fuming of Latent Fingerprints. *J. Forensic Sci.* 51 (6), 1323–1328. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00258.x>.
 - [47] Wargacki, S. P.; Lewis, L. A.; Dadmun, M. D.(2007) Understanding the Chemistry of the Development of Latent Fingerprints by Superglue Fuming. *J. Forensic Sci.* 52 (5), 1057–1062. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00527.x>.
 - [48] Wargacki, S. P.; Lewis, L. A.; Dadmun, M. D.(2008) Enhancing the Quality of Aged Latent Fingerprints Developed by Superglue Fuming: Loss and Replenishment of Initiator. *J. Forensic Sci.* 53 (5), 1138–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00822.x>.
 - [49] West Technology Systems Limited Mission Statement, Employees and Hiring | LinkedIn https://uk.linkedin.com/company/west-technology-systems-limited?trk=public_profile_topcard_current_company (accessed Jun 25, 2020).
 - [50] Vela-Romera, A.; Carriel, V.; Martín-Piedra, M. A.; Aneiros-Fernández, J.; Campos, F.; Chato-Astrain, J.; Prados-Olleta, N.; Campos, A.; Alaminos, M.; Garzón, I.(2019) Characterization of the Human Ridged and Non-Ridged Skin: A Comprehensive Histological, Histochemical and Immunohistochemical Analysis. *Histochem. Cell Biol.* 151 (1), 57–73. <https://doi.org/10.1007/s00418-018-1701-x>.
 - [51] Carlson, B. M.; Carlson, B. M.(2019) Skin. *Hum. Body* 65–85. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804254-0.00003-X>.
 - [52] James, W.; Elston, D.; Treat, J.; Rosenbach, M.; Neuhaus, I.(2016) *Andrews' Diseases of the Skin 13th Edition*, 13th ed.; Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0007-1226\(78\)90109-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1226(78)90109-1).
 - [53] Maceo, A. V.(2009) Qualitative Assessment of Skin Deformation: A Pilot Study. *J. Forensic Identif.* 390 (594).
 - [54] Ficheiro:502 Layers of epidermis.jpg – Wikipédia, a enciclopédia livre https://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:502_Layers_of_epidermis.jpg (accessed Jun 25, 2020).
 - [55] Swensson O, Langbein L, McMillan JR, Stevens HP, Leigh IM, McLean WH, Lane EB, E. R.(1998) Specialized Keratin Expression Pattern in Human Ridged Skin as an Adaptation to High Physical Stress. *Br. J. Dermatol.* 139 (5), 767–775.
 - [56] Mescher, A.(2016) *Junqueira's Basic Histology TEXT AND ATLAS*, 14th ed.; McGraw-Hill Education: New York.
 - [57] Freinkel, R. K.; Woodley, D. T.(2001) *The Biology of Skin*; The Parthenon: New York.
 - [58] Cove, J. H., Holland, K. T., Cunliffe, W. J. .(1980) An Analysis of Sebum Excretion Rate, Bacterial Population and the Production Rate of Free Fatty Acids on Human Skin. *Br. J. Dermatology* 103 (4), 383–386.

- [59] Labors, J. N.; Preti, G.; Hoelzle, E.; Leyden, J.; Kligman, A.(1979) Steroid Analysis of Human Apocrine Secretion. *Steroids* 34 (3), 249–258. [https://doi.org/10.1016/0039-128X\(79\)90077-1](https://doi.org/10.1016/0039-128X(79)90077-1).
- [60] Toth, I.; Faredin, I.(1985) Steroid Excreted by Human Skin. II. C19-Steroid Sulfates in Human Axillary Sweat. *Acta Med. Hung.* 42 (91), 21–28.
- [61] Labows, J. N.; Preti, G.; Hoelzle, E.; Leyden, J.; Kligman, A.(1979) Steroid Analysis of Human Apocrine Secretion. *Steroids* 34 (1), 249–258. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-128X\(79\)90077-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0039-128X(79)90077-1).
- [62] Szöllősi, A. G.; Oláh, A.; Bíró, T.; Tóth, B. I.(2017) Recent Advances in the Endocrinology of the Sebaceous Gland. *1980* (November), 1–9. <https://doi.org/10.1080/19381980.2017.1361576>.
- [63] E. Haahti.(1961) Major Lipid Constituents of Human Skin Surface - Gas-Chromatographic Methods. *Scand., J. Clin. Lab. Invest.* 13, 13.
- [64] R.S. Greene; Downing, D. T.; Pochi, P. E.; Strauss, J. S.(1970) Anatomical Variation in the Amount and Composition of Human Skin Surface Lipid. *J. Invest. Dermatol.* 54 (3), 240–247.
- [65] Olsen, R. D.(1972) The Chemical Composition of Palmar Sweat. *Fingerpr. Ident. Mag.* 53 (10), 3–23.
- [66] Fuchs, E.(1990) Epidermal Differentiation – the Bare Essentials. *J. Cell Biol.* 111 (6), 2807–2814.
- [67] Quinton, P. M.(1983) Sweating and Its Disorders. *Annu. Rev. Med.* 34, 429–452.
- [68] K. Wilke; Martin, A.; Terstegen, L.; Biel, S. S.(2007) A Short History of Sweat Gland Biology. *Int. J. Cosmet. Sci.* 29 (3), 169–179.
- [69] M.Harker; H.Coulson; Fairweather, I.; D.Taylor; Daykin C.A.(2006) Study of Metabolite Composition of Eccrine Sweat from Healthy Male and Female Human Subjects by ¹H NMR Spectroscopy. *Metabolomics* 2 (3), 105–112.
- [70] Folk, G. E.; A. Semken.(1991) The Evolution of Sweat Glands. *J. Biometeorol.* 35 (3), 180–186.
- [71] Claudy, A.(2003) Cutaneous Lipids: From Physiology to Clinics. *Pathol. Biol. (Paris)* 51 (5), 260–263.
- [72] P. Ramasastry; Downing, D. T.; Pochi, P. E.; Strauss, J. S.(1970) Chemical Composition of Human Skin Surface Lipids from Birth to Puberty. *J. Invest. Dermatol.* 54 (2), 139–144.
- [73] D.T. Downing; Strauss, J. S.(1974) Synthesis and Composition of Surface Lipids of Human Skin. *J. Invest. Dermatol.* 62 (3), 228–244.
- [74] P.E. Pochi; Strauss, J. S.; D.T. Downing.(1979) Age-Related Changes in Sebaceous Gland Activity. *J. Invest. Dermatol.* 73 (1), 108–111.
- [75] A. Pappas; Anthonavage, M.; J.S. Gordon.(2002) Metabolic Fate and Selective Utilization of Major Fatty Acids in Human Sebaceous Gland. *J. Invest. Dermatol.* 118, 164–171.
- [76] Niemann, C.; Horsley, V.(2012) Development and Homeostasis of the Sebaceous Gland. *Semin Cell Dev Biol.* 23 (8), 928–936. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.08.010>.

- [77] Schneider, M. R.; Paus, R.(2010) Sebocytes, Multifaceted Epithelial Cells: Lipid Production and Holocrine Secretion. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2), 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.11.017>.
- [78] Bernier, U. R.; Kline, D. L.; Barnard, D. R.; Schreck, C. E.; Yost, R. A.(2000) Analysis of Human Skin Emanations by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 2. Identification of Volatile Compounds That Are Candidate Attractants for the Yellow Fever Mosquito (*Aedes Aegypti*). *Anal. Chem.* 72 (4), 747–756. <https://doi.org/10.1021/ac990963k>.
- [79] Jia, Y.; Gan, Y.; He, C.; Chen, Z.; Zhou, C.(2017) The Mechanism of Skin Lipids Influencing Skin Status. *J. Dermatol. Sci.* 89 (2), 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.006>.
- [80] H., E. H.; Jr., L.; Robinson, O.; Laub., J. H.(2011) *Fingerprint Source Book*; U.S. Department of Justice, O. of J. P., Ed.; National Institute of Justice: Washington DC, USA.
- [81] Girod, A.; Ramotowski, R.; Weyermann, C.(2012) Composition of Fingerprint Residue: A Qualitative and Quantitative Review. *Forensic Sci. Int.* 223 (1–3), 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.05.018>.
- [82] Burger, F.; Dawson, M.; Roux, C.; Maynard, P.; Doble, P.; Kirkbride, P.(2005) Forensic Analysis of Condom and Personal Lubricants by Capillary Electrophoresis. *Talanta* 67 (2), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.03.040>.
- [83] Banas, A.; Banas, K.; Breese, M. B. H.; Loke, J.; Lim, S. K.(2014) Spectroscopic Detection of Exogenous Materials in Latent Fingerprints Treated with Powders and Lifted off with Adhesive Tapes. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (17), 4173–4181. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7806-8>.
- [84] Bradshaw, R.; Wolstenholme, R.; Ferguson, L. S.; Sammon, C.; Mader, K.; Claude, E.; Blackledge, R. D.; Clench, M. R.; Francese, S.(2013) Spectroscopic Imaging Based Approach for Condom Identification in Condom Contaminated Fingerprints. *Analyst* 2546–2557. <https://doi.org/10.1039/c3an00195d>.
- [85] Fritz, P.; van Bronswijk, W.; Lepkova, K.; Lewis, S. W.; Lim, K. F.; Martin, D. E.; Puskar, L.(2013) Infrared Microscopy Studies of the Chemical Composition of Latent Fingerprint Residues. *Microchem. J.* 111, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.08.005>.
- [86] Girod, A.; Xiao, L.; Reedy, B.; Roux, C.; Weyermann, C.(2015) Fingerprint Initial Composition and Aging Using Fourier Transform Infrared Microscopy (FT-IR). *Forensic Sci. Int.* 254, 185–196. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.022>.
- [87] Xu, L.; Zhang, C.; He, Y.; Su, B.(2015) Advances in the Development and Component Recognition of Latent Fingerprints. *Sci. China Chem.* 58 (7), 1090–1096. <https://doi.org/10.1007/s11426-014-5294-5>.
- [88] Ng, P. H. R.; Walker, S.; Tahtouh, M.; Reedy, B.(2009) Detection of Illicit Substances in Fingerprints by Infrared Spectral Imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (8), 2039–2048. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2806-9>.
- [89] Coyle, T.; Anwar, N.(2009) A Novel Approach to Condom Lubricant Analysis: In-Situ Analysis of Swabs by FT-Raman Spectroscopy and Its Effects on DNA Analysis. *Sci. Justice* 49 (1), 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2008.04.003>.
- [90] Day, J. S.; Edwards, H. G. M.; Dobrowski, S. A.; Voice, A. M.(2004) The Detection of

- Drugs of Abuse in Fingerprints Using Raman Spectroscopy II: Cyanoacrylate-Fumed Fingerprints. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 60 (8–9), 1725–1730. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2003.09.013>.
- [91] Frick, A. A.; Chidlow, G.; Lewis, S. W.; van Bronswijk, W.(2015) Investigations into the Initial Composition of Latent Fingermark Lipids by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 254, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.06.032>.
- [92] Girod, A.; Weyermann, C.(2014) Lipid Composition of Fingermark Residue and Donor Classification Using GC/MS. *Forensic Sci. Int.* 238, 68–82. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.02.020>.
- [93] Szabóová, Ž.; Galbavá, P.; Szabó, A. H.; Cigáň, M.; Nižnanský, Ľ.; Kubinec, R.; Blaško, J.(2017) GC–MS/MS Method for Age Determination of Fingerprints. *Monatshefte fur Chemie* 148 (9), 1673–1678. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-1984-y>.
- [94] King, S.; Benson, S.; Kelly, T.; Lennard, C.(2013) Determining the Effects of Routine Fingermark Detection Techniques on the Subsequent Recovery and Analysis of Explosive Residues on Various Substrates. *Forensic Sci. Int.* 233 (1–3), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.09.018>.
- [95] Spencer, S. E.; Kim, S. Y.; Kim, S. B.; Schug, K. A.(2011) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry Profiling of Trace Constituents of Condom Lubricants in the Presence of Biological Fluids. *Forensic Sci. Int.* 207 (1–3), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.08.010>.
- [96] Bradshaw, R.; Wolstenholme, R.; Blackledge, R. D.; Clench, M. R.; Ferguson, L. S.; Francese, S.(2011) A Novel Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging Based Methodology for the Identification of Sexual Assault Suspects. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (3), 415–422. <https://doi.org/10.1002/rcm.4858>.
- [97] Hart, P. J.; Francese, S.; Claude, E.; Woodroffe, M. N.; Clench, M. R.(2011) MALDI-MS Imaging of Lipids in Ex Vivo Human Skin. *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (1), 115–125. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5090-4>.
- [98] Bradshaw, R.; Bleay, S.; Wolstenholme, R.; Clench, M. R.; Francese, S.(2013) Towards the Integration of Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry Imaging into the Current Fingermark Examination Workflow. *Forensic Sci. Int.* 232 (1–3), 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.07.013>.
- [99] Francese, S.; Bradshaw, R.; Ferguson, L. S.; Wolstenholme, R.; Clench, M. R.; Bleay, S.(2013) Beyond the Ridge Pattern: Multi-Informative Analysis of Latent Fingermarks by MALDI Mass Spectrometry. *Analyst* 138 (15), 4215–4228. <https://doi.org/10.1039/c3an36896c>.
- [100] Ferguson, L. S.; Wulfert, F.; Wolstenholme, R.; Fonville, J. M.; Clench, M. R.; Carolan, V. A.; Francese, S.(2012) Direct Detection of Peptides and Small Proteins in Fingermarks and Determination of Sex by MALDI Mass Spectrometry Profiling. *Analyst* 137 (20), 4686. <https://doi.org/10.1039/c2an36074h>.
- [101] Kaplan-Sandquist, K.; LeBeau, M. A.; Miller, M. L.(2014) Chemical Analysis of Pharmaceuticals and Explosives in Fingermarks Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 235, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.11.016>.

- [102] Rowell, F.; Seviour, J.; Lim, A. Y.; Elumbaring-Salazar, C. G.; Loke, J.; Ma, J.(2012) Detection of Nitro-Organic and Peroxide Explosives in Latent Fingermarks by DART- and SALDI-TOF-Mass Spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 221 (1–3), 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.04.007>.
- [103] Taschuk, M. T.; Tsui, Y. Y.; Fedosejevs, R.(2006) Detection and Mapping of Latent Fingerprints by Laser-Induced Breakdown Spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 60 (11), 1322–1327.
- [104] Hong, S.; Han, A.(2016) Development of Fingermark on the Surface of Fired Cartridge Casing Using Amino Acid Sensitive Reagents: Change of Viewpoint. *Forensic Sci. Int.* 266, 86–90. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.05.010>.
- [105] Knowles, A. M.(1978) Aspects of Physicochemical Methods for the Detection of Latent Fingerprints. *Journal of Physics E: Scientific Instruments.* 1978, pp 713–721. <https://doi.org/10.1088/0022-3735/11/8/001>.
- [106] Thomas, G. L.(1978) The Physics of Fingerprints and Their Detection. *Journal of Physics E: Scientific Instruments.* 1978, pp 722–731. <https://doi.org/10.1088/0022-3735/11/8/002>.
- [107] Salama, J.; Aumeer-Donovan, S.; Lennard, C.; Roux, C.(2008) Evaluation of the Fingermark Reagent Oil Red O as a Possible Replacement for Physical Developer. *J. Forensic Identif.* 58 (2), 203–237.
- [108] Ramotowski, R.; Bandey, H.; Bleay, S.; Gibson, R.(2012) Powders for Fingerprint Development. In *Lee and Gaensslen's Advances in Fingerprint Technology, Third Edition*; CRC Press; pp 191–218. <https://doi.org/10.1201/b12882-9>.
- [109] Sauzier, G.; Frick, A. A.; Lewis, S. W.(2013) Investigation into the Performance of Physical Developer Formulations for Visualizing Latent Fingerprints on Paper. *J. Forensic Identif.* 70 (1).
- [110] Bleay, S. M.; Croxton, R. S.; Puit, M. De.(2018) *Fingerprint Development Techniques: Theory and Application*, 1st Editio.; John Wiley & Sons, Ed.; Chichester, UK.
- [111] Wang, M.; Li, M.; Yu, A.; Zhu, Y.; Yang, M.; Mao, C.(2017) Fluorescent Nanomaterials for the Development of Latent Fingerprints in Forensic Sciences. *Adv. Funct. Mater.* 27 (14). <https://doi.org/10.1002/adfm.201606243>.
- [112] Almog, J.; Azoury, M.; Elmaliah, Y.; Berenstein, L.; Zaban, A.(2004) Fingerprints' Third Dimension: The Depth and Shape of Fingerprints Penetration into Paper—Cross Section Examination by Fluorescence Microscopy. *J. Forensic Sci.* 49 (5), 1–5. <https://doi.org/10.1520/jfs2004009>.
- [113] J.M. Duff; Menzel, E. R.(1978) Laser Assistedted Thin-Layer Chromatography and Lumi- Nescence of Fingerprints: An Approach to Fingerprint Age Determination. *J. Forensic Sci.* 23 (1), 129–134.
- [114] Tahtouh, M.(2008) Reagents for Infrared Chemical Imaging of Fingerprints on Difficult Surfaces, University of Tecnology, Sydney.
- [115] Tahtouh, M.; Scott, S. A.; Kalman, J. R.; Reedy, B. J.(2011) Four Novel Alkyl 2-Cyanoacylate Monomers and Their Use in Latent Fingermark Detection by Mid-Infrared Spectral Imaging. *Forensic Sci. Int.* 207 (1–3), 223–238. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.012>.
- [116] Bentsen, R. K.; Brown, J. K.; Dinsmore, A.; Harvey, K. K.; Kee, T. G. Post Firing

- Visualisation of Fingerprint on Spent Cartridge Cases. *Sci. Justice* 36 (1), 3–8. [https://doi.org/10.1016/s1355-0306\(96\)72547-9](https://doi.org/10.1016/s1355-0306(96)72547-9).
- [117] Richmond-Aylor, A.; Bell, S.; Callery, P.; Morris, K.(2007) Thermal Degradation Analysis of Amino Acids in Fingerprint Residue by Pyrolysis GC-MS to Develop New Latent Fingerprint Developing Reagents. *J. Forensic Sci.* 52 (2), 380–382. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00384.x>.
- [118] Tang, H. W.; Lu, W.; Che, C.-M.; Ng, K.-M.(2010) Gold Nanoparticles and Imaging Mass Spectrometry: Double Imaging of Latent Fingerprints. *Anal. Chem.* 82 (5), 1589–1593. <https://doi.org/10.1021/ac9026077>.
- [119] Archer, N. E.; Charles, Y.; Elliott, J. A.; Jickells, S.(2005) Changes in the Lipid Composition of Latent Fingerprint Residue with Time after Deposition on a Surface. *Forensic Sci. Int.* 154 (2–3), 224–239. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.120>.
- [120] Girod, A.; Spyratou, A.; Holmes, D.; Weyermann, C.(2016) Aging of Target Lipid Parameters in Fingerprint Residue Using GC/MS: Effects of Influence Factors and Perspectives for Dating Purposes. *Sci. Justice* 56 (3), 165–180. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.12.004>.
- [121] Weyermann, C.; Roux, C.; Champod, C.(2011) Initial Results on the Composition of Fingerprints and Its Evolution as a Function of Time by GC/MS Analysis. *J. Forensic Sci.* 56 (1), 102–108. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01523.x>.
- [122] Pleik, S.; Spengler, B.; Schäfer, T.; Urbach, D.; Luhn, S.; Kirsch, D.(2016) Fatty Acid Structure and Degradation Analysis in Fingerprint Residues. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (9), 1565–1574. <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1429-6>.
- [123] Wolstenholme, R.; Bradshaw, R.; Clench, M. R.; Francese, S.(2009) Study of Latent Fingermarks by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging of Endogenous Lipids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (19), 3031–3039. <https://doi.org/10.1002/rcm.4218>.
- [124] Dam, A. Van; Schwarz, J. C. V; Vos, J. De; Siebes, M.; Sijen, T.; Leeuwen, T. G. Van; Aalders, M. C. G.; Lambrechts, S. A. G.(2014) Oxidation Monitoring by Fluorescence Spectroscopy Reveals the Age of Fingermarks. *Angew. Chemie Int. Ed.* 6272–6275. <https://doi.org/10.1002/anie.201402740>.
- [125] Bright, N. J.; Willson, T. R.; Driscoll, D. J.; Reddy, S. M.; Webb, R. P.; Bleay, S.; Ward, N. I.; Kirkby, K. J.; Bailey, M. J.(2013) Chemical Changes Exhibited by Latent Fingerprints after Exposure to Vacuum Conditions. *Forensic Sci. Int.* 230 (1–3), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.03.047>.
- [126] Thakar, M. K.; Kaur, P.; Sharma, T.(2018) Validation Studies on Gender Determination from Fingerprints with Special Emphasis on Ridge Characteristics. *Egypt. J. Forensic Sci.* 8 (1). <https://doi.org/10.1186/s41935-018-0049-7>.
- [127] Tandon, A.; Sircar, K.; Chowdhry, A.; Popli, D. B.(2016) Pattern Analysis for Gender Determination- A Ray of Hope. *J. Punjab Acad. Forensic Med. Toxicol.* 16 (2), 80–84.
- [128] Gutiérrez-Redomero, E.; Alonso, C.; Romero, E.; Galera, V.(2008) Variability of Fingerprint Ridge Density in a Sample of Spanish Caucasians and Its Application to Sex Determination. *Forensic Sci. Int.* 180 (1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.06.014>.
- [129] Nayak, V. C.; Rastogi, P.; Kanchan, T.; Lobo, S. W.; Yoganarasimha, K.; Nayak, S.; Rao, N. G.; Pradeep Kumar, G.; Suresh Kumar Shetty, B.; Menezes, R. G.(2010) Sex

- Differences from Fingerprint Ridge Density in the Indian Population. *J. Forensic Leg. Med.* 17 (2), 84–86. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2009.09.002>.
- [130] Gutiérrez-Redomero, E.; Alonso, M. C.; Dipierri, J. E.(2011) Sex Differences in Fingerprint Ridge Density in the Mataco-Mataguayo Population. *HOMO- J. Comp. Hum. Biol.* 62 (6), 487–499. <https://doi.org/10.1016/j.jchb.2011.05.001>.
- [131] Gutiérrez-Redomero, E.; Sánchez-Andrés, Á.; Rivaldería, N.; Alonso-Rodríguez, C.; Dipierri, J. E.; Martín, L. M.(2013) A Comparative Study of Topological and Sex Differences in Fingerprint Ridge Density in Argentinian and Spanish Population Samples. *J. Forensic Leg. Med.* 20 (5), 419–429. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2012.12.002>.
- [132] Nayak, V. C.; Rastogi, P.; Kanchan, T.; Yoganarasimha, K.; Kumar, G. P.; Menezes, R. G.(2010) Sex Differences from Fingerprint Ridge Density in Chinese and Malaysian Population. *Forensic Sci. Int.* 197 (1–3), 67–69. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.055>.
- [133] Brunelle, E.; Huynh, C.; Le, A. M.; Halámková, L.; Agudelo, J.; Halánek, J.(2016) New Horizons for Ninhydrin: Colorimetric Determination of Gender from Fingerprints. *Anal. Chem.* 88 (4), 2413–2420. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04473>.
- [134] Mangle, M. F.; Xu, X.; de Puit, M.(2015) Performance of 1,2-Indanedione and the Need for Sequential Treatment of Fingerprints. *Sci. Justice* 55 (5), 343–346. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.04.002>.
- [135] Mekkaoui Alaoui, I.; Halamek, J.(2019) Fluorescence of 1,2-Indanedione with Amino Acids Present in the Fingerprint Residue: Application in Gender Determination. *J. Forensic Sci.* 64 (5), 1495–1499. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.14025>.
- [136] Jun-wen, S. H. I.; Ling-na, Z.; Rong-liang, M. A.; Bing, W.; Han-qing, C.; Meng, W.; Hai-fang, W.; Wei-yue, F.(2019) Chemical Analysis and Imaging of Fingerprints by Air-Flow Assisted Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chinese J. Anal. Chem.* 47 (12), 1909–1914. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61205-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61205-3).
- [137] van Helmond, W.; van Herwijnen, A. W.; van Riemsdijk, J. J. H.; van Bochove, M. A.; de Poot, C. J.; de Puit, M.(2019) Chemical Profiling of Fingerprints Using Mass Spectrometry. *Forensic Chem.* 16. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100183>.
- [138] Stewart, M. E., Steele, W. A., and Downing, D. T.(1998) Changes in the Relative Amounts of Endogenous and Exogenous Fatty Acids in Sebaceous Lipids during Early Adolescence. *J. Invest. Dermat.* 92 (3), 371–378.
- [139] Nazzaro-Porro, M.; Passi, S.; Boniforti, L.; Belsito, F.(1979) Effects of Aging on Fatty Acids in Skin Surface Lipids. *J. Invest. Dermatol.* 73 (1), 112–117. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12532793>.
- [140] Hemmila, A.; McGill, J.; Ritter, D.(2008) Fourier Transform Infrared Reflectance Spectra of Latent Fingerprints: A Biometric Gauge for the Age of an Individual. In *Journal of Forensic Sciences*; Vol. 53, pp 369–376. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00649.x>.
- [141] Antoine, K. M.; Mortazavi, S.; Miller, A. D.; Miller, L. M.(2010) Chemical Differences Are Observed in Children's versus Adults' Latent Fingerprints as a Function of Time. *J. Forensic Sci.* 55 (2), 513–518. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2009.01262.x>.
- [142] Jones, N. E.; Davies, L. M.; Russell, C. A. L.; Brennan, J. S.; Bramble, S. K.(2001) A Systematic Approach to Latent Fingerprint Sample Preparation for Comparative

- Chemical Studies. *J. Forensic Identif.* 51 (5), 504–515.
- [143] Croxton, R. S.; Baron, M. G.; Butler, D.; Kent, T.; Sears, V. G.(2010) Variation in Amino Acid and Lipid Composition of Latent Fingerprints. *Forensic Sci. Int.* 199 (1–3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.019>.
- [144] Koenig, A.; Girod, A.; Weyermann, C.(2011) Identification of Wax Esters in Latent Print Residues by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Their Potential Use as Aging Parameters. *J. Forensic Identif.* 61 (6), 652–676.
- [145] Ricci, C.; Kazarian, S. G.(2010) Collection and Detection of Latent Fingermarks Contaminated with Cosmetics on Nonporous and Porous Surfaces. *Surf. Interface Anal.* 42 (5), 386–392. <https://doi.org/10.1002/sia.3098>.
- [146] Benton, M.; Chua, M. J.; Gu, F.; Rowell, F.; Ma, J.(2010) Environmental Nicotine Contamination in Latent Fingermarks from Smoker Contacts and Passive Smoking. *Forensic Sci. Int.* 200 (1–3), 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.022>.
- [147] West, M. J.; Went, M. J.(2008) The Spectroscopic Detection of Exogenous Material in Fingerprints after Development with Powders and Recovery with Adhesive Lifters. *Forensic Sci. Int.* 174 (1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.02.026>.
- [148] West, M. J.; Went, M. J.(2009) The Spectroscopic Detection of Drugs of Abuse in Fingerprints after Development with Powders and Recovery with Adhesive Lifters. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 71 (5), 1984–1988. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.07.024>.
- [149] Ng, P. H. R.; Walker, S.; Tahtouh, M.; Reedy, B.(2009) Detection of Illicit Substances in Fingerprints by Infrared Spectral Imaging. *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (8), 2039–2048. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2806-9>.
- [150] Johnson, H. L.; Maibach, H. I.(1971) Drug Excretion in Human Eccrine Sweat. *J. Invest. Dermatol.* 56 (3), 182–188. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260784>.
- [151] Clubley, M.; Bye, C. E.; Henson, T.; Peck, A. W.; Riddington, C.(1978) A Technique for Studying the Effects of Drugs on Human Sweat Gland Activity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14 (3), 221–226. <https://doi.org/10.1007/BF02089963>.
- [152] Szykowska, M. I.; Czerski, K.; Rogowski, J.; Paryjczak, T.; Parczewski, A.(2009) ToF-SIMS Application in the Visualization and Analysis of Fingerprints after Contact with Amphetamine Drugs. *Forensic Sci. Int.* 184 (1–3). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2008.11.003>.
- [153] Szykowska, M. I.; Czerski, K.; Rogowski, J.; Paryjczak, T.; Parczewski, A.(2010) Detection of Exogenous Contaminants of Fingerprints Using ToF-SIMS. *Surf. Interface Anal.* 42 (5), 393–397. <https://doi.org/10.1002/sia.3193>.
- [154] Marples, R. R.; Downing, D. T.; Kligman, A. M.(1971) Control of Free Fatty Acids in Human Surface Lipids by *Corynebacterium Acnes*. *J. Invest. Dermatol.* 56 (2), 127–131. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260695>.
- [155] Wolfe, J.; Exline, D. L.(2003) Characterization of Condom Lubricant Components Using Raman Spectroscopy and Raman Chemical Imaging. *J. Forensic Sci.* 48 (5), 1065–1074.
- [156] Campbell, G. P.; Gordon, A. L.(2007) Analysis of Condom Lubricants for Forensic Casework. *J. Forensic Sci.* 52 (3), 630–642. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00411.x>.
- [157] Maynard, P.; Allwell, K.; Roux, C.; Dawson, M.; Royds, D.(2001) A Protocol for the

- Forensic Analysis of Condom and Personal Lubricants Found in Sexual Assault Cases. *Forensic Sci. Int.* 124 (2–3), 140–156. [https://doi.org/10.1016/s0379-0738\(01\)00588-6](https://doi.org/10.1016/s0379-0738(01)00588-6).
- [158] Blackledge, R. D.; Vincenti, M.(1994) Identification of Polydimethylsiloxane Lubricant Traces from Latex Condoms in Cases of Sexual Assault. *J. Forensic Sci. Soc.* 34 (4), 245–256. [https://doi.org/10.1016/S0015-7368\(94\)72928-5](https://doi.org/10.1016/S0015-7368(94)72928-5).
- [159] (2013) Method of the Year 2012. *Nature Methods*. Nature Publishing Group January 1, 2013, p 1. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2329>.
- [160] Aebersold, R.; Mann, M.(2016) Mass-Spectrometric Exploration of Proteome Structure and Function. *Nature*. Nature Publishing Group September 14, 2016, pp 347–355. <https://doi.org/10.1038/nature19949>.
- [161] J.J. Thomson | Biography, Nobel Prize, & Facts | Britannica <https://www.britannica.com/biography/J-J-Thomson> (accessed Jun 25, 2020).
- [162] (2013) Scripps Center for Metabolomics https://masspec.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=msHistory# (accessed Jun 17, 2020).
- [163] Aston’s first mass spectrograph, c. 1919. | Science Museum Group Collection <https://collection.sciencemuseumgroup.org.uk/objects/co5659/astons-first-mass-spectrograph-c-1919-mass-spectrograph> (accessed Jun 25, 2020).
- [164] Fenn, J. B.(2003) Electrospray Wings for Molecular Elephants (Nobel Lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* 42 (33), 3871–3894. <https://doi.org/10.1002/anie.200300605>.
- [165] Griffiths, J.(2008) A Brief History of Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2008, pp 5678–5683. <https://doi.org/10.1021/ac8013065>.
- [166] van Agthoven, M. A.; Lam, Y. P. Y.; O’Connor, P. B.; Rolando, C.; Delsuc, M. A.(2019) Two-Dimensional Mass Spectrometry: New Perspectives for Tandem Mass Spectrometry. *Eur. Biophys. J.* <https://doi.org/10.1007/s00249-019-01348-5>.
- [167] Thermo Fisher, Orbitrap, History <https://planetorbitrap.com/history> (accessed Jun 20, 2020).
- [168] Yamashita, M.; Fenn, J. B.(1984) Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* 88 (20), 4451–4459. <https://doi.org/10.1021/j150664a002>.
- [169] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M.(1989) Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules. *Science*. 1989, pp 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- [170] Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. L.; Chemistry, D. O.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. D.; Alice, M. B.(1968) Molecular Beams of Macroions. *J. Chem. Phys.* 49 (5), 2240–2249. <https://doi.org/10.1063/1.1670391>.
- [171] Wilm, M.(2011) Principles of Electrospray Ionization. *Molecular and Cellular Proteomics*. July 2011. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>.
- [172] Bruins, A. P.(1998) Mechanistic Aspects of Electrospray Ionization. *Journal of Chromatography A*. 1998, pp 345–357. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(97\)01110-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01110-2).
- [173] Iribarne, J. V.; Dziedzic, P. J.; Thomson, B. A.(1983) Atmospheric Pressure Ion Evaporation-Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 50 (3), 331–347.

- [https://doi.org/10.1016/0020-7381\(83\)87009-0](https://doi.org/10.1016/0020-7381(83)87009-0).
- [174] Gomez, A.; Tang, K.(1994) Charge and Fission of Droplets in Electrostatic Sprays. *Phys. Fluids* 6 (1), 404–414. <https://doi.org/10.1063/1.868037>.
- [175] de Hoffmann, E.; Stroobant, V.(2007) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, Third Edit.; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9589-9_23.
- [176] Banerjee, S.; Mazumdar, S.(2012) Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal. Chem.* 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>.
- [177] Van Berkel, G. J.; Giles, G. E.; Bullock IV, J. S.; Gray, L. J.(1999) Computational Simulation of Redox Reactions within a Metal Electrospray Emitter. *Anal. Chem.* 71 (23), 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac9905266>.
- [178] Wilm, M. S.; Mann, M.(1994) Electrospray and Taylor-Cone Theory, Dole’s Beam of Macromolecules at Last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 136 (2–3), 167–180. [https://doi.org/10.1016/0168-1176\(94\)04024-9](https://doi.org/10.1016/0168-1176(94)04024-9).
- [179] Gaskell, S. J.(1997) Electrospray : Principles and Practice. *J. Mass Spectrom.* 32, 677–688.
- [180] Tang, L.; Kebarle, P.(1993) Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution. *Anal. Chem.* 65 (24), 3654–3668. <https://doi.org/10.1021/ac00072a020>.
- [181] Cooks, R.; Rockwood, A.(1991) The Thomson-A Suggested Unit for Mass Spectroscopists. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 5 (93).
- [182] Comisarow, M. B.; Marshall, A. G.(1974) Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* 25 (2), 282–283. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(74\)89137-2](https://doi.org/10.1016/0009-2614(74)89137-2).
- [183] Marçalo, J.(1997) A Espectrometria de Massa de Ressonância Ciclotrônica de Iões Com Transformada de Fourier. *Química* 66, 32–41.
- [184] Nikolaev, E. N.; Boldin, I. A.; Jertz, R.; Baykut, G.(2011) Initial Experimental Characterization of a New Ultra-High Resolution FTICR Cell with Dynamic Harmonization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (7), 1125–1133. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0125-9>.
- [185] Twelve Million Resolving Power on 4.7 T Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Instrument with Dynamically Harmonized Cell—Observation of Fine Structure in Peptide Mass Spectra | Journal of the American Society for Mass Spectrometry <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jasms.8b04769> (accessed Jun 19, 2020).
- [186] Kaiser, N. K.; Quinn, J. P.; Blakney, G. T.; Hendrickson, C. L.; Marshall, A. G.(2011) A Novel 9.4 Tesla FTICR Mass Spectrometer with Improved Sensitivity, Mass Resolution, and Mass Range. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (8), 1343–1351. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0141-9>.
- [187] Erve, J. C. L.; DeMaio, W.; Talaat, R. E.; Dudley, E.; Newton, R. P.(2008) Rapid Metabolite Identification with Sub Parts-Permillion Mass Accuracy from Biological Matrices by Direct Infusion Nanoelectrospray Ionization after Clean-up on a ZipTip and LTQ/Orbitrap Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (Lc), 3015–3026. <https://doi.org/10.1002/rcm>.

- [188] Fourier-transform ion cyclotron resonance - Wikiwand
https://www.wikiwand.com/en/Fourier-transform_ion_cyclotron_resonance (accessed Jun 25, 2020).
- [189] Brown, L. S.; Gabrielse, G.(1986) Geonium Theory: Physics of a Single Electron or Ion in a Penning Trap. *Rev. Mod. Phys.* 58 (1), 233–311.
<https://doi.org/10.1103/RevModPhys.58.233>.
- [190] Kozlov, V.(2005) WITCH, a Penning Trap for Weak Interaction Studies, Leuven U. ; CERN.
- [191] Wang, N.(2014) Negative Ion Electron Capture Dissociation (NiECD): A Novel Tandem Mass Spectrometric Technique, University of Michigan.
- [192] Bax, A.; Sparke, S. W.; Torchia, D. A.(2011) *Methods in Enzymology*, 1st Ed.; Jameson, D., Malkhey, V., Westerhoff, H. V., Eds.; Elsevier: Manchester, UK; Vol. 176.
- [193] Hendrickson, C. L.; Emmett, M. R.(1999) Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 50 (1), 517–536.
<https://doi.org/10.1146/annurev.physchem.50.1.517>.
- [194] Lobodin, V. V.; Nyadong, L.; Ruddy, B. M.; Curtis, M.; Jones, P. R.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.(2015) DART Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for Analysis of Complex Organic Mixtures. *Int. J. Mass Spectrom.* 378, 186–192. <https://doi.org/10.1016/J.IJMS.2014.07.050>.
- [195] de Almeida, C. M.; Pinto, F. E.; dos Santos, N. A.; de Souza, L. M.; Merlo, B. B.; Thompson, C. J.; Romão, W.(2019) Designer Drugs Analysis by LDI(+), MALDI(+) and MALDI(+) Imaging Coupled to FT-ICR MS. *Microchem. J.* 149, 104002.
<https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.104002>.
- [196] Hughey, C. A.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.(2002) Resolution of 11 000 Compositionally Distinct Components in a Single Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrum of Crude Oil. *Anal. Chem.* 74 (16), 4145–4149. <https://doi.org/10.1021/ac020146b>.
- [197] Brown, S. C.; Kruppa, G.; Dasseux, J. L.(2005) Metabolomics Applications of FT-ICR Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2), 223–231.
<https://doi.org/10.1002/mas.20011>.
- [198] Brown, S. C.; Kruppa, G.; Dasseux, J.-L.(2005) Metabolomics Applications of FT-ICR Mass Spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2), 223–231.
<https://doi.org/10.1002/mas.20011>.
- [199] da Costa G, Guerreiro A, Correia CF, Gomes RJ, Freire A, Monteiro E, Barroso E, Coelho AV, Outeiro TF, Freire AP, C. C.(2010) A Non-Invasive Method Based on Saliva to Characterize Transthyretin in Familial Amyloidotic Polyneuropathy Patients Using FT-ICR High-Resolution MS. *Proteomics Clin Appl.* 4 (6–7), 674–678.
- [200] Kooijman, P. C.; Nagornov, K. O.; Kozhinov, A. N.; Kilgour, D. P. A.; Tsybin, Y. O.; Heeren, R. M. A.; Ellis, S. R.(2019) Increased Throughput and Ultra-High Mass Resolution in DESI FT-ICR MS Imaging through New-Generation External Data Acquisition System and Advanced Data Processing Approaches. *Sci. Rep.* 9 (1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36957-1>.
- [201] Colati, K. A. P.; Dalmaschio, G. P.; de Castro, E. V. R.; Gomes, A. O.; Vaz, B. G.; Romão, W.(2013) Monitoring the Liquid/Liquid Extraction of Naphthenic Acids in Brazilian Crude Oil Using Electrospray Ionization FT-ICR Mass Spectrometry (ESI FT-

- ICR MS). *Fuel* 108, 647–655. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2013.02.007>.
- [202] Bergen, H. R.; Vasmatzis, G.; Cliby, W. A.; Johnson, K. L.; Oberg, A. L.; Muddiman, D. C.(2003) Discovery of Ovarian Cancer Biomarkers in Serum Using NanoLC Electrospray Ionization TOF and FT-ICR Mass Spectrometry. *Dis. Markers* 19 (4–5), 239–249. <https://doi.org/10.1155/2004/797204>.
- [203] Soltow, Q. A.; Jones, D. P.; Promislow, D. E. L.(2010) A Network Perspective on Metabolism and Aging. *Integr. Comp. Biol.* 50 (5), 844–854. <https://doi.org/10.1093/icb/icq094>.
- [204] Jeandeta, P.; Heinzmannb, S. S.; Roullier-Gallb, C.; Cilindred, C.; Aronc, A.; Devillee, M. A.; Moritzb, F.; Karbowiakc, T.; Demarvillef, D.; Brunf, C.; Moreauf, F.; Michalkeb, B.; Liger-Belaïrd, G.; Wittingb, M.; Lucio, M.; Steyerg, D.; Gougeonc, R. D.; Schmitt-Kopplin, P.(2015) Chemical Messages in 170-Year-Old Champagne Bottles from the Baltic Sea: Revealing Tastes from the Past. *Natl. Acad. Sci.* 112 (19), 5893–5898.
- [205] de Hoffmann, E.; Stroobant, V.(2008) *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; Vol. 45. <https://doi.org/10.5860/choice.45-4389>.
- [206] Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R.(2005) The Orbitrap: A New Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40, 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>.
- [207] OrbitrapMA&Injector - Orbitrap - Wikipedia <https://en.wikipedia.org/wiki/Orbitrap#/media/File:OrbitrapMA&Injector.png> (accessed Jun 25, 2020).
- [208] Zubarev, R. A.; Makarov, A.(2013) Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 85, 2. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- [209] Gavard, R.; Palacio Lozano, D. C.; Guzman, A.; Rossell, D.; Spencer, S. E. F.; Barrow, M. P.(2019) Rhapsody: Automatic Stitching of Mass Segments from Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra. *Anal. Chem.* 91 (23), 15130–15137. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b03846>.
- [210] Peltz, C.; Drahoš, L.; Vékey, K.(2007) SORI Excitation: Collisional and Radiative Processes. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (12), 2119–2126. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2007.09.011>.
- [211] Cooper, H. J.; Akbarzadeh, S.; Heath, J. K.; Zeller, M.(2005) Data-Dependent Electron Capture Dissociation FT-ICR Mass Spectrometry for Proteomic Analyses. *J. Proteome Res.* 4 (5), 1538–1544. <https://doi.org/10.1021/pr050090c>.
- [212] Garnier, N.; Rolando, C.; Høtje, J. M.; Tokarski, C.(2009) Analysis of Archaeological Triacylglycerols by High Resolution NanoESI, FT-ICR MS and IRMPD MS/MS: Application to 5th Century BC–4th Century AD Oil Lamps from Olbia (Ukraine). *Int. J. Mass Spectrom.* 284 (1–3), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2009.03.003>.
- [213] Shaw, J. B.; Robinson, E. W.; Paša-Tolić, L.(2016) Vacuum Ultraviolet Photodissociation and Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance (FT-ICR) Mass Spectrometry: Revisited. *Anal. Chem.* 88 (6), 3019–3023. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00148>.
- [214] Price, W. D.; Schnier, P. D.; Williams, E. R.(1996) Tandem Mass Spectrometry of Large Biomolecule Ions by Blackbody Infrared Radiative Dissociation. *Anal. Chem.* 68 (5), 859–866. <https://doi.org/10.1021/ac951038a>.

- [215] Hecht, E. S.; Scigelova, M.; Eliuk, S.; Makarov, A.(2019) Fundamentals and Advances of Orbitrap Mass Spectrometry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; Wiley; pp 1–40. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9309.pub2>.
- [216] Perry, R. H.; Cooks, R. G.; Noll, R. J.(2008) Orbitrap Mass Spectrometry: Instrumentation, Ion Motion and Applications. *Mass Spectrom. Rev.* 27 (6), 661–699. <https://doi.org/10.1002/mas.20186>.
- [217] Hu, Q.; Talaty, N.; Noll, R. J.; Cooks, R. G.(2006) Desorption Electrospray Ionization Using an Orbitrap Mass Spectrometer: Exact Mass Measurements on Drugs and Peptides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (22), 3403–3408. <https://doi.org/10.1002/rcm.2757>.
- [218] Lee, J. H.; Park, H. N.; Kim, N. S.; Park, S.; Lee, Y. M.; Kang, H.(2020) Development of a Specific Fragmentation Pattern-Based Quadrupole-OrbitrapTM Mass Spectrometry Method to Screen Drugs in Illicit Products. *Sci. Justice* 60 (1), 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2019.08.001>.
- [219] Pan, M.; Xiang, P.; Yu, Z.; Zhao, Y.; Yan, H.(2019) Development of a High-Throughput Screening Analysis for 288 Drugs and Poisons in Human Blood Using Orbitrap Technology with Gas Chromatography-High Resolution Accurate Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1587, 209–226. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.022>.
- [220] Helfer, A. G.; Michely, J. A.; Weber, A. A.; Meyer, M. R.; Maurer, H. H.(2017) Liquid Chromatography-High Resolution-Tandem Mass Spectrometry Using Orbitrap Technology for Comprehensive Screening to Detect Drugs and Their Metabolites in Blood Plasma. *Anal. Chim. Acta* 965, 83–95. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.03.002>.
- [221] Mokhtar, S. U.; Chadin Kulsing, .; Althakafy, J. T.; Kotsos, A.; Drummer, O. H.; Philip, Marriott, J.(2020) Simultaneous Analysis of Drugs in Forensic Cases by Liquid Chromatography-High-Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *Chromatographia* 1 (83), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10337-019-03814-w>.
- [222] Xu, X.; Koeberg, M.; Kuijpers, C. J.; Kok, E.(2014) Development and Validation of Highly Selective Screening and Confirmatory Methods for the Qualitative Forensic Analysis of Organic Explosive Compounds with High Performance Liquid Chromatography Coupled with (Photodiode Array and) LTQ Ion Trap/Orbitrap Ma. *Sci. Justice* 54 (1), 3–21. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2013.08.003>.
- [223] Hagan, N.; Goldberg, I.; Graichen, A.; St. Jean, A.; Wu, C.; Lawrence, D.; Demirev, P.(2017) Ion Mobility Spectrometry - High Resolution LTQ-Orbitrap Mass Spectrometry for Analysis of Homemade Explosives. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 28 (8), 1531–1539. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1666-3>.
- [224] Bridoux, M. C.; Schwarzenberg, A.; Schramm, S.; Cole, R. B.(2016) Combined Use of Direct Analysis in Real-Time/Orbitrap Mass Spectrometry and Micro-Raman Spectroscopy for the Comprehensive Characterization of Real Explosive Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (21), 5677–5687. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9691-9>.
- [225] Chen, T. H.; Wu, S. P.(2017) Forensic Applications of Direct Analysis in Real Time (DART) Coupled to Q-Orbitrap Tandem Mass Spectrometry for the in Situ Analysis of Pigments from Paint Evidence. *Forensic Sci. Int.* 277, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.06.001>.
- [226] Sun, Q.; Luo, Y.; Yang, X.; Xiang, P.; Shen, M.(2016) Detection and Identification of Dyes in Blue Writing Inks by LC-DAD-Orbitrap MS. *Forensic Sci. Int.* 261, 71–81.

- <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.01.038>.
- [227] Dorakumbura, B. N.; Buseti, F.; Lewis, S. W.(2020) Analysis of Squalene and Its Transformation By-Products in Latent Fingermarks by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High Resolution Accurate Mass Orbitrap™ Mass Spectrometry. *Forensic Chem.* 17. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2019.100193>.
- [228] Almog, J.; Cantu, A. A.; Champod, C.; Kent, T.; Lennard, C.(2014) Guidelines for the Assessment of Fingerprint Detection Techniques International Fingerprint Research Group (IFRG). *J. Forensic Identif.* 64 (2), 174–197.
- [229] Steiner, R.; Roux, C.; Moret, S.(2019) Controlling Fingerprint Variability for Research Purposes: A Review. *Wiley Interdiscip. Rev. Forensic Sci.* No. March, e1338. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1338>.
- [230] Mil'shtein, S.; Doshi, U.(2004) Scanning the Pressure-Induced Distortion of Fingerprints. *Scanning* 26 (6), 270–272. <https://doi.org/10.1002/sca.4950260603>.
- [231] Van Helmond, W.; Kuijpers, C. J.; Van Diejen, E.; Spiering, J.; Maagdelijn, B.; De Puit, M.(2017) Amino Acid Profiling from Fingerprints, a Novel Methodology Using UPLC-MS. *Anal. Methods* 9 (38). <https://doi.org/10.1039/c7ay01603d>.
- [232] Rivas-ubach, A.; Liu, Y.; Bianchi, T. S.; Tolic, N.; Jansson, C.(2018) Moving beyond the van Krevelen Diagram: A New Stoichiometric Approach for Compound Classification in Organisms. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00529>.
- [233] Vranová, E.; Coman, D.; Gruissem, W.(2012) Structure and Dynamics of the Isoprenoid Pathway Network. *Mol. Plant* 5 (2), 318–333. <https://doi.org/10.1093/mp/sss015>.
- [234] Staneloni, R.; Ugalde, R.; Leloir, L.(1980) Addition of Glucose to Dolichyl Diphosphate Oligosaccharide and Transfer to Protein. 1980, pp 275–278.
- [235] Pezdirc, K.; Hutchesson, M. J.; Williams, R. L.; Rollo, M. E.; Burrows, T. L.; Wood, L. G.; Oldmeadow, C.; Collins, C. E.(2016) Consuming High-Carotenoid Fruit and Vegetables Influences Skin Yellowness and Plasma Carotenoids in Young Women: A Single-Blind Randomized Crossover Trial. *J. Acad. Nutr. Diet.* 116 (8), 1257–1265. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2016.03.012>.
- [236] Aguilar, S. S.; Wengreen, H. J.; Lefevre, M.; Madden, G. J.; Gast, J.(2014) Skin Carotenoids: A Biomarker of Fruit and Vegetable Intake in Children. *J. Acad. Nutr. Diet.* 114 (8), 1174–1180. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2014.04.026>.
- [237] Schreiber, R.; Taschler, U.; Preiss-Landl, K.; Wongsiriroj, N.; Zimmermann, R.; Lass, A.(2012) Retinyl Ester Hydrolases and Their Roles in Vitamin A Homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821 (1), 113–123. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.05.001>.
- [238] Curley, R. W.(2012) Retinoid Chemistry: Synthesis and Application for Metabolic Disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821 (1), 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.04.007>.
- [239] Bonet, M. L.; Ribot, J.; Palou, A.(2012) Lipid Metabolism in Mammalian Tissues and Its Control by Retinoic Acid. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821 (1), 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.06.001>.
- [240] Bury, M.; Andolfi, A.; Rogister, B.; Cimmino, A.; Mégallizzi, V.; Mathieu, V.; Feron, O.; Evidente, A.; Kiss, R.(2013) Fusicoccin A, a Phytotoxic Carbocyclic Diterpene Glucoside of Fungal Origin, Reduces Proliferation and Invasion of Glioblastoma Cells

- by Targeting Multiple Tyrosine Kinases. *Transl. Oncol.* 6 (2), 112–123. <https://doi.org/10.1593/tlo.12409>.
- [241] Tsuboi, K.; Okamoto, Y.; Ikematsu, N.; Inoue, M.; Shimizu, Y.; Uyama, T.; Wang, J.; Deutsch, D. G.; Burns, M. P.; Ulloa, N. M.; Tokumura, A.; Ueda, N.(2011) Enzymatic Formation of N-Acylethanolamines from N-Acylethanolamine Plasmalogen through N-Acylphosphatidylethanolamine-Hydrolyzing Phospholipase D-Dependent and -Independent Pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1811 (10), 565–577. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2011.07.009>.
- [242] Greaves, R. F.; Jevalikar, G.; Hewitt, J. K.; Zacharin, M. R.(2015) A Guide to Understanding the Steroid Pathway: New Insights and Diagnostic Implications. *Clin. Biochem.* 47 (15), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.07.017>.
- [243] Wudy, S. A.; Schuler, G.; Sánchez-Guijo, A.; Hartmann, M. F.(2017) The Art of Measuring Steroids. Principles and Practice of Current Hormonal Steroid Analysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* No. July, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>.
- [244] Agarwal, M. K.; Mirshahi, M.(1999) General Overview of Mineralocorticoid Hormone Action. *Pharmacol. Ther.* 84 (3), 273–326. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(99\)00038-8](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(99)00038-8).
- [245] Griffiths, W. J.; Abdel-Khalik, J.; Hearn, T.; Yutuc, E.; Morgan, A. H.; Wang, Y.(2016) Current Trends in Oxysterol Research. *Biochem. Soc. Trans.* 44 (2), 652–658. <https://doi.org/10.1042/BST20150255>.
- [246] Schroeffer, G. J.(2000) Oxysterols: Modulators of Cholesterol Metabolism and Other Processes. *Physiol. Rev.* 80 (1), 361–554. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.361>.
- [247] Lee, S.; Lim, H.-S.; Shin, H.-J.; Kim, S.-A.; Park, J.; Kim, H.-C.; Kim, H.; Kim, H. J.; Kim, Y.-T.; Lee, K.-R.; Kim, Y.-J.(2014) Simultaneous Determination of Cortisol and Cortisone from Human Serum by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Anal. Methods Chem.* 2014, 787483. <https://doi.org/10.1155/2014/787483>.
- [248] Christie, W. W.(2018) The Lipid Web <http://www.lipidhome.co.uk/index.html> (accessed Mar 16, 2018).
- [249] Marcos, J.; Pozo, O. J.(2016) Current LC–MS Methods and Procedures Applied to the Identification of New Steroid Metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 162, 41–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.012>.
- [250] Gao, W.; Kirschbaum, C.; Grass, J.; Stalder, T.(2016) LC–MS Based Analysis of Endogenous Steroid Hormones in Human Hair. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 162, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.12.022>.
- [251] Mezzullo, M.; Fanelli, F.; Fazzini, A.; Gambineri, A.; Vicennati, V.; Di Dalmazi, G.; Pelusi, C.; Mazza, R.; Pagotto, U.; Pasquali, R.(2016) Validation of an LC–MS/MS Salivary Assay for Glucocorticoid Status Assessment: Evaluation of the Diurnal Fluctuation of Cortisol and Cortisone and of Their Association within and between Serum and Saliva. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 163, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.04.012>.
- [252] Molinaro, A.; Wahlström, A.; Marschall, H. U.(2018) Role of Bile Acids in Metabolic Control. *Trends Endocrinol. Metab.* 29 (1), 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.002>.
- [253] Lips, P.(2006) Vitamin D Physiology. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92 (1), 4–8.

- <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.016>.
- [254] Henry, H. L.(2011) Regulation of Vitamin D Metabolism. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 25 (4), 531–541. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2011.05.003>.
- [255] Webb, A. R.(2006) Who, What, Where and When-Influences on Cutaneous Vitamin D Synthesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 92 (1), 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.004>.
- [256] Cermenati, G.; Mitro, N.; Audano, M.; Melcangi, R. C.; Crestani, M.; De Fabiani, E.; Caruso, D.(2015) Lipids in the Nervous System: From Biochemistry and Molecular Biology to Patho-Physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851 (1), 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.08.011>.
- [257] Van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W.(2008) Membrane Lipids: Where They Are and How They Behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>.
- [258] Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y.(2006) Epidermal Sphingolipids: Metabolism, Function, and Roles in Skin Disorders. *FEBS Lett.* 580 (23), 5456–5466. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.039>.
- [259] Van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A.(2014) The Important Role of Stratum Corneum Lipids for the Cutaneous Barrier Function. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841 (3), 295–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.00>.
- [260] Reinertson, R. P.; Wheatley, V. R.(1959) Studies on the Chemical Composition of Human Epidermal Lipids. *J. Invest. Dermatol.* 32 (1), 49–59. <https://doi.org/10.1038/jid.1959.11>.
- [261] Feingold, K. R.; Elias, P. M.(2014) Role of Lipids in the Formation and Maintenance of the Cutaneous Permeability Barrier. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841 (3), 280–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.11.007>.
- [262] Feingold, K. R.(2007) The Role of Epidermal Lipids in Cutaneous Permeability Barrier Homeostasis. *J. Lipid Res.* 48 (12), 2531–2546. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700013-JLR200>.
- [263] (2008) *Lipids in Health and Disease*; Wang, P. J. Q. and X., Ed.; Springer: London.
- [264] Ishikawa, J.; Narita, H.; Kondo, N.; Hotta, M.; Takagi, Y.; Masukawa, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Koyano, S.; Yamazaki, S.; Hatamochi, A.(2010) Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J. Invest. Dermatol.* 130 (10), 2511–2514. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.161>.
- [265] Koser, K.; Cunningham, A. E.(2016) Why Preventing Violent Extremism Is the Private Sector’s Business. In *Global Terrorism Index 2016 Measuring and Understanding the Impact of Terrorism*; pp 79–80.
- [266] Conflict Armament Research.(2016) *Tracing the Supply of Components Used in Islamic State IED’s*; London.
- [267] Nascimento Correa, D.; Melendez-Perez, J. J.; Jardim Zacca, J.; Borges, R.; Morgado Schmidt, E.; Eberlin, M. N.; Meurer, E. C.(2017) Direct Detection of Triacetone Triperoxide (TATP) in Real Banknotes from ATM Explosion by EASI-MS. *Propellants, Explos. Pyrotech.* 42 (4), 370–375. <https://doi.org/10.1002/prep.201600046>.
- [268] S. Zitrin, S. Kraus, B. G.(1984) Identification of Two Rare Explosives. *Proc. Int. Symp.*

- Anal. Detect. Explos. Quantico, Virginia* 137–141.
- [269] Chladek, J.(1993) The Identification of Organic Peroxides. *Adv. Anal. Detect. Explos.* No. Proceedings of the Fourth International Symposium of the Analytical Detection of Explosives, Yinon, J., Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 73–76.
- [270] Matyáš, R.; Šelešovský, J.; Musil, T.(2012) Study of TATP: Mass Loss and Friction Sensitivity during Ageing. *Cent. Eur. J. Energ. Mater.* 9 (3), 251–260.
- [271] (2011) *Forensic Investigation of Explosions.*, Second Edi.; Beveridge, Alexander, E., Ed.; CRC press.
- [272] Lu, D.; Cagan, A.; Munoz, R. a a; Tangkuaram, T.; Wang, J.(2006) Highly Sensitive Electrochemical Detection of Trace Liquid Peroxide Explosives at a Prussian-Blue “artificial-Peroxidase” Modified Electrode. *Analyst* 131 (12), 1279–1281. <https://doi.org/10.1039/b613092e>.
- [273] Suslick, H. L. and K. S.(2010) Colorimetric Sensor Array for Detection of Triacetone Triperoxide TATP Vapor. *Hengwei Lin Kenneth S. Suslick* 132 (Figure 2), 15519. <https://doi.org/10.1021/ja107419t>.
- [274] Girotti, S.; Ferri, E.; Maiolini, E.; Bolelli, L.; D’Elia, M.; Coppe, D.; Romolo, F. S.(2011) A Quantitative Chemiluminescent Assay for Analysis of Peroxide-Based Explosives. *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2), 313–320. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4626-3>.
- [275] Mills, A.; Grosshans, P.; Snadden, E.(2009) Hydrogen Peroxide Vapour Indicator. *Sensors Actuators, B Chem.* 136 (2), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.12.032>.
- [276] Walter, M. A.; Pfeifer, D.; Kraus, W.; Emmerling, F.; Schneider, R. J.; Panne, U.; Weller, M. G.(2010) Triacetone Triperoxide (TATP): Hapten Design and Development of Antibodies. *Langmuir* 26 (19), 15418–15423. <https://doi.org/10.1021/la1018339>.
- [277] Buttigieg, G. A.; Knight, A. K.; Denson, S.; Pommier, C.; Denton, M. B.(2003) Characterization of the Explosive Triacetone Triperoxide and Detection by Ion Mobility Spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 135 (1), 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00175-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00175-0).
- [278] Guerra-díaz, P.; Gura, S.; Almirall, R.(2010) Dynamic Planar Solid Phase Microextraction - Ion Mobility Spectrometry for Rapid Field Air Sampling and Analysis of Illicit Drugs and Explosives. *Anal Chem* 82 (7), 2826–2835.
- [279] Räsänen, R.-M.; Nousiainen, M.; Peräkorpi, K.; Sillanpää, M.; Polari, L.; Anttalainen, O.; Utriainen, M.(2008) Determination of Gas Phase Triacetone Triperoxide with Aspiration Ion Mobility Spectrometry and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 623 (1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.076>.
- [280] Fan, W.; Young, M.; Canino, J.; Smith, J.; Oxley, J.; Almirall, J. R.(2012) Fast Detection of Triacetone Triperoxide (TATP) from Headspace Using Planar Solid-Phase Microextraction (PSPME) Coupled to an IMS Detector. *Anal Bioanal Chem* 403, 401–408. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5878-x>.
- [281] Kozole, J.; Levine, L. A.; Tomlinson-Phillips, J.; Stairs, J. R.(2015) Gas Phase Ion Chemistry of an Ion Mobility Spectrometry Based Explosive Trace Detector Elucidated by Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* 140, 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.001>.

- [282] Tomlinson-Phillips, J.; Wooten, A.; Kozole, J.; Deline, J.; Beresford, P.; Stairs, J.(2014) Characterization of TATP Gas Phase Product Ion Chemistry via Isotope Labeling Experiments Using Ion Mobility Spectrometry Interfaced with a Triple Quadrupole Mass Spectrometer. *Talanta* 127, 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.03.044>.
- [283] Schulte-Ladbeck, R.; Edelmann, A.; Quintás, G.; Lendl, B.; Karst, U.(2006) Determination of Peroxide-Based Explosives Using Liquid Chromatography with on-Line Infrared Detection. *Anal. Chem.* 78 (23), 8150–8155. <https://doi.org/10.1021/ac0609834>.
- [284] Crowson, A.; Beardah, M. S.(2001) Development of an LC/MS Method for the Trace Analysis of Hexamethylenetriperoxidediamine (HMTD). *Analyst* 126 (10), 1689–1693. <https://doi.org/10.1039/b107354k>.
- [285] Hiyoshi, R. I.; Nakamura, J.; Brill, T. B.(2007) Thermal Decomposition of Organic Peroxides TATP and HMTD by T-Jump / FTIR Spectroscopy. 2 (2), 127–134. <https://doi.org/10.1002/prop.200700002>.
- [286] Wackerbarth, Hainer; Salb C.; Gundrum L. Niederkruger M. Christou K, Beushausen V, V. W.(2010) Detection of Explosives Based on Surface-Enhanced Raman Spectrometry. *Appl Opt* 49 (23), 4362–4366.
- [287] Oxley, J.; Smith, J.; Brady, J.; Dubnikova, F.; Kosloff, R.; Zeiri, L.; Zeiri, Y.(2008) Raman and Infrared Fingerprint Spectroscopy of Peroxide-Based Explosives. *Appl. Spectrosc.* 62 (8), 906–915. <https://doi.org/10.1366/000370208785284420>.
- [288] Harris, G. A.; Galhena, A. S.; Fernández, F. M.(2011) Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: Applications and Current Trends. *Anal. Chem.* 83 (12), 4508–4538. <https://doi.org/10.1021/ac200918u>.
- [289] McLuckey, S. A.; Wells, J. M.(2001) Mass Analysis at the Advent of the 21st Century. *Chem. Rev.* 101 (2), 571–606. <https://doi.org/10.1021/cr990087a>.
- [290] Cotte-Rodriguez, I.; Mulligan, C. C.; Cooks, G.(2007) Non-Proximate Detection of Small and Large Molecules by Desorption Electrospray Ionization and Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry: Instrumentation and Applications in Forensics, Chemistry, and Biology. *Anal. Chem.* 79 (18), 7069–7077. <https://doi.org/10.1021/ac0707939>.
- [291] Takáts, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R. G.(2005) Direct, Trace Level Detection of Explosives on Ambient Surfaces by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Commun.* No. 15, 1950–1952. <https://doi.org/10.1039/B418697D>.
- [292] Cotte-Rodríguez, I.; Cooks, R. G.(2006) Non-Proximate Detection of Explosives and Chemical Warfare Agent Simulants by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Commun.* No. 28, 2968–2970. <https://doi.org/10.1039/B606020J>.
- [293] Cotte-Rodríguez, I.; Hernández-Soto, H.; Chen, H.; Cooks, R. G.(2008) In Situ Trace Detection of Peroxide Explosives by Desorption Electrospray Ionization and Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionization. *Anal. Chem.* 80 (5), 1512–1519. <https://doi.org/10.1021/ac7020085>.
- [294] Detata, D.; Collins, P.; McKinley, A.(2013) A Fast Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (LC-QToF-MS) Method for the Identification of Organic Explosives and Propellants. *Forensic Sci. Int.* 233 (1–3), 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.08.007>.

- [295] Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M. (1990) Electrospray Ionization—Principles and Practice. *Mass Spectrom. Rev.* 9 (1), 37–70. <https://doi.org/10.1002/mas.1280090103>.
- [296] Holmgren, E.; Carlsson, H.; Goede, P.; Crescenzi, C. (2005) Determination and Characterization of Organic Explosives Using Porous Graphitic Carbon and Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1099 (1–2), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.08.088>.
- [297] Crescenzi, C.; Albiñana, J.; Carlsson, H.; Holmgren, E.; Batlle, R. (2007) On-Line Strategies for Determining Trace Levels of Nitroaromatic Explosives and Related Compounds in Water. *J. Chromatogr. A* 1153 (1–2), 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.055>.
- [298] Tachon, R.; Pichon, V.; Borgne, M. B. Le; Minet, J. J. (2007) Use of Porous Graphitic Carbon for the Analysis of Nitrate Ester, Nitramine and Nitroaromatic Explosives and by-Products by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1154 (1–2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.059>.
- [299] Yinon, J.; McClellan, J. E.; Yost, R. A. (1997) Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry Collision-Induced Dissociation Study of Explosives in an Ion Trap Mass Spectrometer. *Oct. Rapid Commun. Mass Spectrom* 11, 1961–1970.
- [300] Widmer, L.; Watson, S.; Schlatter, K.; Crowson, A. (2002) Development of an LC/MS Method for the Trace Analysis of Triacetone Triperoxide (TATP). *Analyst* 127 (12), 1627–1632. <https://doi.org/10.1039/B208350G>.
- [301] Xu, X.; Van De Craats, A. M.; Kok, E. M.; De Bruyn, P. C. A. (2004) Trace Analysis of Peroxide Explosives by High Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS) for Forensic Applications. *J. Forensic Sci.* 49 (6), 1230–1236.
- [302] Sigman, M. E.; Clark, C. D.; Caiano, T.; Mullen, R. (2008) Analysis of Triacetone Triperoxide (TATP) and TATP Synthetic Intermediates by Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 84–90.
- [303] Peña-Quevedo, A. J.; Laramée, J. A.; Durst, H. D.; Hernández-Rivera, S. P. (2011) Cyclic Organic Peroxides Characterization by Mass Spectrometry and Raman Microscopy. *IEEE Sens. J.* 11 (4), 1053–1060. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2010.2057730>.
- [304] Nilles, J. M.; Connell, T. R.; Stokes, S. T.; Dupont Durst, H. (2010) Explosives Detection Using Direct Analysis in Real Time (DART) Mass Spectrometry. *Propellants, Explos. Pyrotech.* 35 (5), 446–451. <https://doi.org/10.1002/prop.200900084>.
- [305] Justes, D. R.; Talaty, N.; Cotte-Rodriguez, I.; Cooks, R. G. (2007) Detection of Explosives on Skin Using Ambient Ionization Mass Spectrometry. *Chem. Commun. (Camb)*. No. 21, 2142–2144. <https://doi.org/10.1039/b703655h>.
- [306] Chen, H.; Cooks, R. G.; Cotte-Rodríguez, I.; Chen, H.; Cooks, R. G. (2006) Rapid Trace Detection of Triacetone Triperoxide (TATP) by Complexation Reactions during Desorption Electrospray Ionization. *Chem. Commun. (Camb)*. No. 9, 953–955. <https://doi.org/10.1039/b515122h>.
- [307] van Dam, A.; van Beek, F. T.; Aalders, M. C. G.; van Leeuwen, T. G.; Lambrechts, S. A. G. (2016) Techniques That Acquire Donor Profiling Information from Fingermarks - A Review. *Sci. Justice* 56 (2), 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2015.12.002>.

- [308] Pachman, J.; Matyáš, R.(2011) Study of TATP: Stability of TATP Solutions. *Forensic Sci. Int.* 207 (1–3), 212–214. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.10.010>.
- [309] Matyáš, R.; Chýlková, J.(2013) Study of TATP: Method for Determination of Residual Acids in TATP. *Forensic Sci. Int.* 228 (1–3), 170–173. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.01.007>.
- [310] Reany, O.; Kapon, M.; Botoshansky, M.; Keinan, E.(2009) Rich Polymorphism in Triacetone-Triperoxide. *Cryst. Growth Des.* 9 (8), 3661–3670. <https://doi.org/10.1021/cg900390y>.
- [311] Wu, Z.; Hendrickson, C. L.; Rodgers, R. P.; Marshall, A. G.(2002) Composition of Explosives by Electrospray Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 74 (8), 1879–1883. <https://doi.org/10.1021/ac011071z>.
- [312] Milas, N.; Golubovic, A.(1959) Studies in Organic Peroxides. XXVI. Organic Peroxides Derived from Acetone and Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 81 (24), pp 6461–6462.
- [313] Milas, N.; Golubović, A.(1959) Studies in Organic Peroxides. XXIV. Preparation, Separation and Identification of Peroxides Derived from Diethyl Ketone and Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 81 (13), pp 3361–3364.
- [314] Milas, N.; Golubović, A.(1959) Studies in Organic Peroxides. XXV. Preparation, Separation and Identification of Peroxides Derived from Methyl Ethyl Ketone and Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 81 (21), pp 5824–5826. <https://doi.org/DOI:10.1021/ja01530a068>.
- [315] Sigman, M. E.; Clark, C. D.; Painter, K.; Milton, C.; Simatos, E.; Frisch, J. L.; McCormick, M.; Bitter, J. L.(2009) Analysis of Oligomeric Peroxides in Synthetic Triacetone Triperoxide Samples by Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun. mass Spectrom.* 23, 349–356. <https://doi.org/10.1002/rcm.3879>.
- [316] Schulte-ladbeck, R.; Kolla, P.; Karst, U.(2003) Trace Analysis of Peroxide-Based Explosives. *Anal Chem* 75 (4), 731–735. <https://doi.org/10.1021/ac020392n>.
- [317] Egorshv, V. Y.; Sinditskii, V. P.; Smirnov, S. P.(2013) A Comparative Study on Two Explosive Acetone Peroxides. *Thermochim. Acta* 574, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2013.08.009>.
- [318] Lís, M.; Cífková, E.; Khalikova, M.; Ov, M.; Hol, M.(2017) Lipidomic Analysis of Biological Samples: Comparison of Liquid Chromatography, Supercritical Fluid Chromatography and Direct Infusion Mass Spectrometry Methods. *1525*, 96–108. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.022>.
- [319] Buszewski, B.; Noga, S.(2012) Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)-a Powerful Separation Technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Springer January 2012, pp 231–247. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>.
- [320] Guo, Y.; Gaiki, S.(2005) Retention Behavior of Small Polar Compounds on Polar Stationary Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography. *J. Chromatogr. A* 1074 (1–2), 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.058>.
- [321] Tang, D. Q.; Zou, L.; Yin, X. X.; Ong, C. N.(2016) HILIC-MS for Metabolomics: An Attractive and Complementary Approach to RPLC-MS. *Mass Spectrom. Rev.* 35 (5), 574–600. <https://doi.org/10.1002/mas.21445>.
- [322] Contrepolis, K.; Jiang, L.; Snyder, M.(2015) Optimized Analytical Procedures for the

- Untargeted Metabolomic Profiling of Human Urine and Plasma by Combining Hydrophilic Interaction (HILIC) and Reverse-Phase Liquid Chromatography (RPLC)-Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 14 (6), 1684–1695. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.046508>.
- [323] Stuart, M.; Ross, S. M.(2004) *Introduction to Probability and Statistics for Engineers and Scientists.*, Third Edit.; Elsevier Academic Press: California, USA. <https://doi.org/10.2307/2982792>.
- [324] Harrigan, G. G.; Goodacre, R.(2003) Introduction. In *Metabolic Profiling: Its Role in Biomarker Discovery and Gene Function Analysis*; Springer US; pp 1–8. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0333-0_1.
- [325] Mütze, U.(2017) Jean-Marie Saudubray, Matthias R. Baumgartner, John Walter (Eds.). Inborn Metabolic Diseases: Diagnosis and Treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* 40 (1), 165–165. <https://doi.org/10.1007/s10545-016-0008-0>.
- [326] Zhang, P.; Chan, W.; Ang, I. L.; Wei, R.; Lam, M. M. T.; Lei, K. M. K.; Poon, T. C. W.(2019) Revisiting Fragmentation Reactions of Protonated α -Amino Acids by High-Resolution Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Collision-Induced Dissociation. *Sci. Rep.* 9 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42777-8>.
- [327] Carey, F. A.(1992) *Organic Chemistry*, Second Edi.; Emry, K., Damstra, D., Eds.; McGraw-Hill: New York.
- [328] Armirotti, A.; Millo, E.; Damonte, G.(2007) How to Discriminate Between Leucine and Isoleucine by Low Energy ESI-TRAP MSn. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.08.011>.
- [329] Carey, F. A.; Sundberg, R. J.(2002) Advanced Organic Chemistry. *Journal of Chemical Education*. Springer 2002, p 21. <https://doi.org/10.1093/jaoac/34.2.496>.
- [330] De Puit, M.; Ismail, M.; Xu, X.(2014) LCMS Analysis of Fingerprints, the Amino Acid Profile of 20 Donors. *J. Forensic Sci.* 59 (2), 364–370. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.12327>.
- [331] Croxton, R. S.; Baron, M. G.; Butler, D.; Kent, T.; Sears, V. G.(2010) Variation in Amino Acid and Lipid Composition of Latent Fingerprints. *Forensic Sci. Int.* 199 (1–3), 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.019>.
- [332] Dutra, F.; Knudsen, F. S.; Curi, D.; Bechara, E. J. H.(2001) Aerobic Oxidation of Aminoacetone, a Threonine Catabolite: Iron Catalysis and Coupled Iron Release from Ferritin. *Chem. Res. Toxicol.* 14 (9), 1323–1329. <https://doi.org/10.1021/tx015526r>.
- [333] Bechara, E. J. H.; Dutra, F.; Cardoso, V. E. S.; Sartori, A.; Olympio, K. P. K.; Penatti, C. A. A.; Adhikari, A.; Assunção, N. A.(2007) The Dual Face of Endogenous α -Aminoketones: Pro-Oxidizing Metabolic Weapons. *Comp. Biochem. Physiol.* 146, 88–110. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.07.004>.
- [334] Kerwin, J. L.; Wiens, A. M.; Ericsson, L. H.(1996) Identification of Fatty Acids by Electrospray Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 31 (2), 184–192. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(199602\)31:2<184::AID-JMS283>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(199602)31:2<184::AID-JMS283>3.0.CO;2-2).
- [335] Ohtake, S.; Wang, Y. J.(2011) Trehalose: Current Use and Future Applications. *J. Pharm. Sci.* 100 (6), 2020–2053. <https://doi.org/10.1002/jps.22458>.
- [336] Gorka, M.; Augsburger, M.; Thomas, A.; Bécue, A.(2019) Molecular Composition of

- Fingermarks: Assessment of the Intra- and Inter-Variability in a Small Group of Donors Using MALDI-MSI. *Forensic Chem.* 12, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.forc.2018.12.002>.
- [337] Zhao, X.; Han, Q.; Liu, Y.; Sun, C.; Gang, X.; Wang, G.(2016) The Relationship between Branched-Chain Amino Acid Related Metabolomic Signature and Insulin Resistance: A Systematic Review. *Journal of Diabetes Research.* 2016, p 2794591. <https://doi.org/10.1155/2016/2794591>.
- [338] Lee, C. C.; Watkins, S. M.; Lorenzo, C.; Wagenknecht, L. E.; Il'Yasova, D.; Chen, Y. D. I.; Haffner, S. M.; Hanley, A. J.(2016) Branched-Chain Amino Acids and Insulin Metabolism: The Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS). *Diabetes Care* 39 (4), 582–588. <https://doi.org/10.2337/dc15-2284>.
- [339] Takashina, C.; Tsujino, I.; Watanabe, T.; Sakaue, S.; Ikeda, D.; Yamada, A.; Sato, T.; Ohira, H.; Otsuka, Y.; Oyama-Manabe, N.; Ito, Y. M.; Nishimura, M.(2016) Associations among the Plasma Amino Acid Profile, Obesity, and Glucose Metabolism in Japanese Adults with Normal Glucose Tolerance. *Nutr. Metab.* 13 (1). <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0059-5>.
- [340] Smith, R. M.; Casale, J. F.(2010) The Mass Spectrum of Cocaine : Deuterium Labeling and MS / MS Studies. *Microgram J.* 7 (1).
- [341] (2019) *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing*, 2nd Ed.; Dasgupta, A., Ed.; Elsevier Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-02017-7>.
- [342] Takeda, S.; Okajima, S.; Miyoshi, H.; Yoshida, K.; Okamoto, Y.; Okada, T.; Amamoto, T.; Watanabe, K.; Omiecinski, C. J.; Aramaki, H.(2012) Cannabidiolic Acid, a Major Cannabinoid in Fiber-Type Cannabis, Is an Inhibitor of MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Migration. *Toxicol. Lett.* 214 (3), 314–319. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.08.029>.
- [343] Smyth, T. J.; Ramachandran, V. N.; McGuigan, A.; Hopps, J.; Smyth, W. F.(2007) Characterisation of Nicotine and Related Compounds Using Electrospray Ionisation with Ion Trap Mass Spectrometry and with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry and Their Detection by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (4), 557–566. <https://doi.org/10.1002/rcm.2871>.
- [344] Cha, H. J.; He, C.; Zhao, H.; Dong, Y.; An, I. S.; An, S.(2016) Intercellular and Intracellular Functions of Ceramides and Their Metabolites in Skin (Review). *Int. J. Mol. Med.* 38 (1), 16–22. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2600>.